



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁵ : C12N 15/74, 1/21	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 93/18164 (43) Date de publication internationale: 16 septembre 1993 (16.09.93)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR93/00248 (22) Date de dépôt international: 12 mars 1993 (12.03.93) (30) Données relatives à la priorité: 92/03034 13 mars 1992 (13.03.92) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE [FR/FR]; 145, rue de l'Université, F-75007 Paris (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement) : GRUSS, Alexandra [FR/FR]; 55, rue Charlot, F-75003 Paris (FR). MA-GUIN, Emmanuelle [FR/FR]; 16, avenue du Fort, F-92120 Montrouge (FR). (74) Mandataire: MARTIN, Jean-Jacques; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).		(81) Etats désignés: AU, CA, JP, NZ, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>
(54) Title: THERMOSENSITIVE PLASMID (54) Titre: PLASMIDE THERMOSENSIBLE (57) Abstract <p>Bacterial vector plasmid of the type having an efficient replication origin in Gram-positive bacteria. Said plasmid is characterized by having at least one marker gene which expresses itself in a bacterial host strain, an efficient replication system which is thermosensitive based on a temperature compatible with the viability of the host strain, and in that the temperature of replication inhibition is below or equal to approximately 37 °C. The invention also concerns a bacteria containing said plasmid and a process for inactivating a gene in the chromosome of a bacteria.</p> (57) Abrégé <p>La présente invention concerne un plasmide vecteur bactérien du type comportant une origine de réplication efficace dans les bactéries gram positives, caractérisé en ce qui comporte au moins: un gène marqueur qui s'exprime dans une souche hôte bactérienne, un système de réplication efficace qui est thermosensible à partir d'une température compatible avec la viabilité de la souche hôte, en ce que la température d'inhibition de réplication est inférieure ou égale à environ 37 °C, ainsi qu'une bactérie le contenant et un procédé d'inactivation d'un gène présent dans le chromosome d'une bactérie.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	FR	France	MR	Mauritanie
AU	Australie	GA	Gabon	MW	Malawi
BB	Barbade	GB	Royaume-Uni	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	GN	Guinée	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	PL	Pologne
BJ	Bénin	IE	Irlande	PT	Portugal
BR	Brésil	IT	Italie	RO	Roumanie
CA	Canada	JP	Japon	RU	Fédération de Russie
CF	République Centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SK	République slovaque
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SN	Sénégal
CM	Cameroon	LK	Sri Lanka	SU	Union soviétique
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TG	Togo
DE	Allemagne	MG	Madagascar	UA	Ukraine
DK	Danemark	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
ES	Espagne	MN	Mongolie	VN	Viet Nam
FI	Finlande				

PLASMIDE THERMOSENSIBLE

La présente invention concerne un plasmide utilisable pour la modification génétique des bactéries à coloration gram positive, en particulier des bactéries lactiques présentant un intérêt industriel ou médical.

5 Elle concerne également des bactéries contenant un tel plasmide. Elle concerne enfin des procédés de modifications génétiques mettant en oeuvre un tel plasmide, soit pour inactiver un gène normalement présent dans le chromosome bactérien, soit pour introduire et exprimer un gène d'intérêt.

10 De nombreuses bactéries gram à coloration gram positive sont des sujets d'étude comme modèle biologique (par exemple les bactéries du genre Bacillus), comme souche de fermentation d'intérêt industriel (bactéries à acide lactique) ou comme pathogène (par exemple Clostridia, Listeria, Staphylococcus, Streptococcus). Beaucoup de ces souches sont
15 caractérisées d'un point de vue physiologique mais peu ont été étudiées ou modifiées génétiquement. L'étude ou la modification des souches peut être facilitée par l'utilisation de vecteurs permettant des insertions dirigées ou non-spécifiques dans le chromosome bactérien. Des systèmes de délivrance qui sont fondés sur des vecteurs non réplicatifs sont limités aux bactéries
20 qui peuvent être transformées avec une haute fréquence et ceux utilisant des réplicons actifs uniquement sous certaines conditions sont souvent limités à leur spectre d'hôte. Aussi la construction de souches recombinantes requiert un effort important et ne peut être appliquée avec efficacité qu'à certains microorganismes spécifiques.

25 L'addition, la perte ou la modification de gènes peuvent transformer le rôle d'un organisme dans un processus industriel tel que la fermentation.

La biotechnologie cherche à faciliter l'usage industriel de microorganismes. Par exemple, les bactéries lactiques sont utilisées en
30 agroalimentaire, majoritairement pour la fabrication de produits laitiers fermentés, mais aussi en dehors de la filière lait pour la fabrication de vin, cidre, charcuterie et ensilage.

35

Il est donc particulièrement souhaitable de disposer de moyens efficaces d'introduire ou de modifier spécifiquement et définitivement certains gènes dans ces organismes.

Actuellement, la modification du chromosome chez les
5 bactéries lactiques est effectuée par l'intermédiaire d'un système par transformation d'un plasmide non réplcatif. Dans une seule étape, il est nécessaire d'avoir deux évènements de basse fréquence, la transformation par un plasmide, et une recombinaison dans le chromosome. La probabilité d'obtenir ces deux évènements dans une seule étape est le produit des
10 probabilités de chacun ; donc une chance très faible d'obtenir la modification.

Le plasmide pWV01 est un plasmide cryptique initialement isolé chez *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* ; il s'agit d'un plasmide à large spécificité d'hôte, réplcatif à la fois dans des bactéries gram positif
15 et gram négatif, notamment chez *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus* et *Lactobacillus*. Il a été caractérisé et sa séquence nucléotidique a été publiée par Leenhouts et al (1991).

Dans la demande WO 85/03495, de larges fragments de ce plasmide sont utilisés pour construire un plasmide recombinant pGK12, marqué par le gène de résistance à l'érythromycine, et/ou le gène de
20 résistance au chloramphénicol (la chloramphénicol-acétyl-transférase (CAT)). Ce plasmide pGK12 n'est pas utilisable pour faire des intégrations dans le chromosome bactérien.

Les plasmides non réplcatifs utilisés jusqu'à présent
25 permettent de pallier ce problème, mais ce système requiert des taux de transformation élevés pour permettre la détection d'évènements de basse fréquence tels que la transposition ou la recombinaison dans le chromosome ; or la plupart des bactéries lactiques sont faiblement transformables.

L'ensemble de ces difficultés pourrait être surmonté grâce à
30 l'obtention d'un réplcon thermosensible, utilisable comme vecteur de livraison dans les bactéries, lactiques ou autres.

Les plasmides pE194 et PSH71 ont été décrits comme naturellement thermosensibles, au-dessus d'une température de 51° C (J. Bacteriol., 1990, 172, 4543-4548)

C'est pourquoi la présente invention a pour objet un plasmide vecteur bactérien du type comportant une origine de réplication efficace dans les bactéries gram+, caractérisé en ce qu'il comporte au moins :

- un gène marqueur qui s'exprime dans une souche hôte bactérienne,
- un système de réplication efficace qui est thermosensible (Ts) à partir d'une température compatible avec la viabilité de la souche hôte,

et en ce que la température d'inhibition de réplication est inférieure ou égale à environ 37° C.

Le fait que le plasmide selon l'invention soit non réplcatif à 37° C le rend particulièrement approprié dans le cas où les bactéries ont une température de croissance relativement basse, ou lorsqu'un choc thermique important n'est pas souhaitable. Le plasmide selon l'invention est utilisable seul, il n'a pas à être associé à un autre plasmide. L'inhibition de la réplication par des températures supérieures à environ 37° C, n'est pas souche dépendante. Il possède un large spectre d'hôtes et peut s'établir notamment chez les souches classiques appartenant au groupe comprenant :

Bacillus, Enterococcus, Lactobacillus, Lactococcus, Streptococcus, Listeria, Pediococcus, Staphylococcus, Clostridia, Leuconostoc, E. coli. Parmi celles-ci, on peut citer à titre d'exemple les espèces suivantes : B. subtilis, E. faecalis, L. fermentum, L. helveticus, L. bulgaricus, L. lactis, S. pyogenes, S. thermophilus, S. sanguis, L. monocytogenes.

Le plasmide selon l'invention porte au moins un gène codant pour un marqueur de sélection, ainsi que les éléments nécessaires à son expression tels que promoteur, site de fixation des ribosomes, terminateur, etc. Des gènes de sélection sont par exemple des gènes de résistance aux antibiotiques (Erythromycine, chloramphénicol), ou permettant la croissance sur un milieu dépourvu de certains éléments, etc.

Le gène marqueur est intégré dans le chromosome en cas de recombinaison.

Par système de répllication, on entend un système comprenant une origine de répllication ainsi que la protéine induisant son fonctionnement ; ladite protéine est inactivée au-dessus d'une température inhibant le système de répllication.

5 Un tel plasmide se réplique normalement à 28° C, chez un grand nombre de bactéries. A une température supérieure à environ 35° C, la répllication de ce plasmide est inhibée ; cette température inhibitrice de la répllication du plasmide est relativement basse et permet la multiplication et la croissance normale de la plupart des bactéries, en particulier des
10 bactéries lactiques. La température recommandée pour l'inactivation efficace de ce plasmide est de 37° C.

Selon l'un de ses aspects, la présente invention a pour objet un plasmide vecteur, caractérisé en ce qu'il contient le plus grand fragment Cla I du plasmide pWV01, présentant au moins une mutation dans la région
15 Thal-RsaI.

Plus particulièrement, un plasmide vecteur à répllication thermosensible selon l'invention présente au moins une mutation dans la région correspondant à RepA du plasmide pWV01. La protéine RepA est codée par l'un des 4 cadres ouverts de lecture (ORF) identifiés sur pWV01,
20 l'ORF A, et est nécessaire pour la répllication.

Des mutations préférées de ce plasmide se trouvent dans les positions 972, 977, 980 et 987 de la séquence nucléotidique de pWV01.

La protéine RepA codée par le plasmide selon l'invention présente, par rapport au type sauvage, les modifications représentées à la
25 figure 3, à savoir le remplacement de :

- Ser par Asn,
- Asp par Asn,
- Val par Ile,
- Arg par Gln.

30 Un tel plasmide constitue un vecteur suicide à large spécificité d'hôte, d'un type unique jusqu'à nos jours dans le domaine des bactéries lactiques.

En effet, il permet de dissocier en deux étapes, l'intégration dans le chromosome. Dans la première étape de transformation, le plasmide est établi dans la cellule. Dans la deuxième étape, l'évènement d'intégration dans le chromosome est sélectionné par élévation de la température.

5 On peut ainsi modifier génétiquement des bactéries réputées peu transformables.

Plus particulièrement, des plasmides selon l'invention comportent une des séquences représentées sur une des figures 9, 10 ou 11, ou une séquence représentant au moins 80% d'homologie avec ces
10 séquences.

Les outils génétiques ainsi développés permettent d'introduire et de stabiliser des gènes dans le chromosome bactérien.

On choisit par exemple d'appliquer un procédé par recombinaison homologue.

15 Pour cela, on utilise un réplicon thermosensible selon l'invention, qui comporte en outre au moins un fragment d'ADN homologue à l'ADN chromosomique de la bactérie que l'on veut modifier.

Selon l'un de ses aspects, la présente invention a pour objet un procédé d'inactivation d'un gène présent dans le chromosome d'une
20 bactérie, caractérisé en ce que :

- a) on introduit dans la bactérie, par transformation, le plasmide selon l'invention,
- b) on cultive la bactérie sur milieu sélectif à une température inférieure à la température d'inhibition de l'origine de réplication,
- 25 c) on élève la température de culture à une température supérieure à ladite température d'inhibition,
- d) on récupère les bactéries survivantes après plusieurs cycles de multiplication, à température d'inhibition de la réplication plasmidique.

30 L'étape d) permet de sélectionner les bactéries portant le marqueur plasmidique.

Le fragment chromosomique cloné dans le plasmide peut correspondre à un gène précis, qui est spécifiquement inactivé par intégration du plasmide au niveau de la copie chromosomique du gène. Dans la population bactérienne, seul ce site d'intégration sera trouvé.

5 Dans un autre mode de réalisation, l'ADN bactérien présent dans le plasmide pourra être choisi dans une banque de fragments chromosomiques pour le clonage, et il y aura intégration au hasard ; le site d'intégration du plasmide est différent d'une bactérie à l'autre et on réalise ainsi de la mutagenèse.

10 Le procédé peut également s'appliquer à un réplicon thermosensible porteur d'un transposon. On dispose de différents transposons pour mutagéniser le chromosome.

Le plasmide Ts est employé comme porteur d'un de ces transposons éventuellement modifié pour être actif chez *L. lactis*. Chaque
15 transposon porte un gène marqueur (ex: gène de résistance). En appliquant le protocole précédemment décrit (a à c), on obtient, des cellules ayant intégré le transposon dans leurs chromosomes. On sélectionne ces cellules au moyen du marqueur du transposon. Dans le cas de la transposition, le plasmide n'est pas intégré dans le chromosome.

20 En variante, le plasmide vecteur selon l'invention comporte également un locus de mobilisation permettant la conjugaison. De préférence, ce locus de mobilisation est le locus ori T, extrait d'un plasmide de bactérie à gram positif, préférentiellement pouvant être extrait d'un plasmide de *Streptococcus*. Le plasmide vecteur portant ce
25 locus peut être mobilisé et transféré par conjugaison chez des espèces bactériennes non transformables.

Le procédé d'inactivation d'un gène dans une bactérie fait alors intervenir les étapes suivantes :

30 a) on introduit dans la bactérie, par conjugaison, un plasmide selon l'invention, portant un locus de mobilisation et un fragment homologue au chromosome et/ou un transposon,

- b) on cultive la bactérie sur milieu sélectif à une température inférieure à la température d'inhibition de l'origine de répllication,
- c) on élève la température de culture à une température supérieure à ladite température d'inhibition,
- 5 d) on récupère les bactéries survivantes après plusieurs cycles de multiplication, à température d'inhibition de la répllication plasmidique.

Les bactéries obtenues à l'issue de l'étape d) ont subi un évènement de recombinaison ou de transposition et portent le marqueur du transposon ou du plasmide.

En variante, le plasmide vecteur selon l'invention, comporte également un réplicon actif chez E. coli. Le plasmide vecteur portant ce locus, et ces dérivés, peut être propagé chez E. Coli. Les constructions préparées et propagées chez E. coli à 37° C (grâce au deuxième réplicon) peuvent être ensuite transférées dans les bactéries lactiques dans lesquelles seul le réplicon Ts sera actif.

Dans les procédés décrits ci-dessus, après introduction du plasmide vecteur dans la bactérie par transformation ou conjugaison à l'étape a), on laisse le plasmide s'établir dans la population bactérienne, par répllication, à 28-30° C.

Le caractère de sélection est exprimé dans l'ensemble des bactéries. Quand la température s'élève au-dessus de 35° C, le plasmide sous forme libre devient incapable de se répliquer et se trouve donc perdu lors des divisions cellulaires. Seules les bactéries pour lesquelles ce plasmide s'est intégré par recombinaison dans le chromosome ou pour lesquelles le transposon s'est intégré dans le chromosome, conservent et transmettent l'information génétique portée par le plasmide ou le transposon et leur permettant de pousser sur milieu sélectif. On sélectionne ainsi les évènements d'intégration, de basse fréquence, en récupérant les bactéries se multipliant à 35-37° C sur milieu sélectif.

Lorsque le plasmide est intégré dans le chromosome, il présente une excellente stabilité, qui peut être de l'ordre de 99% après 75 générations à 37,5° C.

5 Le schéma suivi pour l'intégration du plasmide par recombinaison homologue est illustré à la figure 6.

La souche L. lactis VE 6002, contenant le plasmide pVE6002 selon l'invention a été déposée à la collection nationale de l'Institut Pasteur, 25-28 rue du Docteur Roux, Paris, sous le numéro I-1179.

10 Selon un autre de ses aspects, l'invention a pour objet un procédé permettant l'introduction d'un gène hétérologue dans une bactérie. Pour sa mise en oeuvre, on utilise un plasmide vecteur thermosensible tel qu'il a pu être défini précédemment, et comportant en outre un gène codant pour une protéine d'intérêt, sous le contrôle des éléments nécessaires à son expression, et qui sont connus de l'homme du métier. Le
15 cas échéant, ce gène pourra être porté par le transposon. On suit alors les étapes indiquées ci-après.

- a) on introduit dans la bactérie, par transformation ou conjugaison un plasmide selon l'invention,
- b) on cultive la bactérie sur milieu sélectif à une température inférieure
20 à la température d'inhibition de l'origine de réplication,
- c) on élève la température de culture à une température supérieure à ladite température d'inhibition,
- d) on récupère les bactéries survivantes après plusieurs cycles de multiplication, à température d'inhibition de la réplication plasmidique.
25

L'étape d) permet de sélectionner les bactéries portant le marqueur du plasmide ou du transposon.

L'invention a également pour objet des bactéries contenant un plasmide selon l'invention, sous forme libre ou intégrée dans le chromosome.
30

De telles bactéries trouveront notamment des applications dans le domaine de l'industrie agroalimentaire, en particulier laitière, ou fromagère.

Dans certains des cas décrits précédemment, on souhaite pouvoir éliminer tout ou une partie du matériel génétique introduit dans le chromosome bactérien par le procédé selon l'invention.

Le procédé de recombinaison homologue permet deux étapes :
5 la première consiste à sélectionner l'évènement d'intégration du plasmide, la seconde étape - qui est facultative - consiste à exciser du chromosome le réplicon et les marqueurs qui ne correspondent pas aux normes alimentaires.

Excision du réplicon : l'intégration par recombinaison
10 homologue crée des duplications de chaque côté du plasmide Ts (Fig. 7a). Il a été montré qu'un plasmide rolling-circle, réplicatif intégré dans le chromosome stimule fortement la recombinaison homologue entre les séquences avoisinantes. Lorsque le fragment chromosomique porté par le plasmide Ts contient un marqueur, les duplications créées par l'intégration
15 permettent d'exciser le réplicon en laissant un gène chromosomique inactif (Fig. 7a). Expérimentalement, il s'agit de cultiver à 28° C la souche contenant le plasmide intégré (préalablement sélectionnée à 37° C). A température permissive, la réplication reprend et stimule la recombinaison entre les séquences répétées aboutissant à la délétion du réplicon (Fig. 7a).

20 La présente invention a également pour objet un plasmide vecteur à réplication thermosensible présentant une ou plusieurs des caractéristiques déjà exposées, et dans lequel une région interne est dupliquée. Les deux séquences identiques sont placées de manière à encadrer la région que l'on souhaite éliminer. Un tel plasmide est alors
25 utilisé dans un procédé d'inactivation d'un gène ou d'introduction d'un gène hétérologue par recombinaison dans le chromosome bactérien, tels que décrits ci-dessus.

A l'issue de l'étape d), les bactéries survivantes sont à nouveau
30 mises en culture à une température inférieure à la température d'inhibition, par exemple à 28-30° C, sur milieu non sélectif. En effet, un plasmide réplicatif stimule fortement la recombinaison homologue entre les

séquences avoisinantes. La souche contenant le plasmide intégré préalablement sélectionnée à 35-37° C est cultivée à température permissive : la réplication plasmidique reprend, stimulant la recombinaison entre les séquences répétées. Le réplicon et les marqueurs incompatibles avec, par exemple, une utilisation agroalimentaire de ce système, sont excisés, avec rétention éventuelle du gène modifié. La sélection des bactéries ayant excisé les marqueurs indésirables se fait après étalement à température non-permissive. Ce mécanisme est illustré sur la figure 7b.

Les exemples qui suivent sont destinés à illustrer l'invention sans aucunement en limiter la portée.

On se référera aux figures suivantes :

FIGURE 1 : cinétique de perte et analyse du nombre de copies de pVE6002 selon l'invention et de pVE6001 non Ts. *L. lactis* subsp. *lactis* IL 1403 portant le plasmide pGK12, pVE6001 ou pVE6002 sont cultivés à 28° C ou 37,5° C. Après différents temps de culture, des échantillons sont prélevés pour être cultivés à 28° C sur des milieux sélectifs et non-sélectifs. 100 colonies sont repiquées à partir du milieu non-sélectif sur le milieu sélectif (Em 5 µg/ml) pour évaluer la proportion de cellules contenant un plasmide dans la population. Les extractions d'ADN total sont faites sur les cultures à 28° C ou 37,5° C, sans sélection, pendant 5h 30.

FIGURE 2 : Plasmide hybride de pGK12 et pVE6002. pVE6043 est constitué du fragment SacI-Thal, de 994 pb, de pGK12, lié au fragment Thal-SacI de 3384 pb de pVE6002. pVE6044 contient la paire réciproque, le fragment SacI-Thal de 994 pb de pVE6002, lié au fragment Thal-SacI de 3384 pb de pGK12. Les traits fins correspondent à l'ADN de pGK12 ; les traits épais pointillés, à l'ADN de pVE6002.

FIGURE 3 : Localisation de la mutation Ts dans le gène RepA de pVE6002. Le fragment *Thal*-*Rsa*I de pVE6002, contenant le gène RepA a été séquencé sur les deux brins. La séquence montre quatre mutations aux positions 972, 977, 980, 987, alors que le reste de la séquence ne diffère pas de la séquence publiée pour le réplicon parental pWV01.

FIGURE 4 : Description des dérivés thermosensibles. pVE6006 est construit par insertion du fragment *Pvu*II de 445 pb de pBluescript SK+ dans le site *Cl*aI de pVE6002.

pVE6007 provient d'une délétion *Sac*I de pVE6006, conduisant à la perte du gène de résistance à l'érythromycine. pVE6004 est construit par insertion du fragment *Pvu*II de 445 pb de pBluescript SK+ dans le fragment *Cl*aI-*Hpa*II de pVE6002 dépourvu de gène de résistance au chloramphénicol.

FIGURE 5 : Comparaison des protéines analogues à Rep de PE.194.

FIGURE 6 : Schéma du procédé d'inactivation d'un gène.

FIGURE 7a : Schéma d'un exemple d'excision du réplicon Ts en deux étapes.

7b : Schéma de l'excision du réplicon au moyen de duplications plasmidiques.

FIGURE 8 : Construction des plasmides pG⁺host5 et pG⁺host6 à partir du plasmide pG⁺host4 (ou pVE6004) : le plasmide pG⁺host5 est construit par insertion du fragment *Ava*I - *Alw*NI de pBR 322 (qui contient l'origine de répllication de pBR 322) dans le pG⁺host4 linéarisé par *Nsi*I.

pG⁺host6 est construit par insertion du fragment *Ava*I - *Eco*RI de pBR 322 (qui contient l'origine de répllication de pBR 322 et le gène de résistance à l'ampicilline) dans le pG⁺host4 linéarisé par *Nsi*I.

FIGURE 9 : Séquence nucléotidique de pG⁺host4.

FIGURE 10 : Séquence nucléotidique de pG⁺host5.

FIGURE 11 : Séquence nucléotidique de pG⁺host6.

Exemple 1 : Préparation et caractérisation d'un plasmide vecteur
thermosensible

5 MATERIELS ET METHODES

Les travaux ont été réalisés au Laboratoire de Génétique Microbienne, Institut de Biotechnologie, INRA, 78352 Jouy-en-Josas cedex France.

10

Souches bactériennes, plasmides et conditions de culture.

Les plasmides et les souches bactériennes utilisées sont indiqués dans le tableau 1. Les constructions de pVE6043 et pVE6044 sont décrites dans la figure 2 ; les plasmides pVE6004, pEV6006 et pVE6007 sont
15 présentés à la figure 4. pVE6004 (ou pG⁺host4) est construit par insertion d'un fragment d'ADN PvuII de 445 pb dans le fragment ClaI-HpaII de 3340 pb à extrémité franche de l'isolat Ts original, dépourvu du gène de résistance Cm. Le fragment PvuII de 445 pb contient un site de
20 multiclonaage, les promoteurs T7 et T3, et les sites pour M13 - 20, T7, T3 et des amorces inverses qui permettent le séquençage direct à partir du vecteur. Ce plasmide est thermosensible dans tous les hôtes testés, y compris chez E. coli et doit être maintenu à 28° C.

E. coli et Bacillus subtilis ont été cultivés en milieu LB. L. lactis subsp. lactis (L. lactis) est cultivé sur milieu M17, dans lequel on a
25 remplacé le lactose par du glucose. On a utilisé respectivement du chloramphénicol (Cm) à 5 µg/ml pour L. lactis et B. subtilis et de l'érythromycine (Em) à 5 µg/ml et 0,5 µg/ml respectivement. Le Cm, l'azaerythromycine et l'érythromycine ont été utilisés à des concentrations
30 finales respectives de 15 µg/ml, 100 µg/ml et 150 µg/ml pour E. coli.

35

35

Clonage moléculaire, compétence et procédure de transformation.

Des enzymes du commerce ont été utilisées comme indiqué par les fournisseurs. Des mini-lysats de cellules entières et du DNA plasmidique ont été préparés ainsi qu'il est décrit dans la littérature. L'induction de compétence et la transformation d'E. coli et de B. subtilis ont été effectuées par des procédures standards (Hanahan, 1985, ou Niaudet et al, 1979). Les souches de L. lactis ont été électrotransformées comme décrit par Langella et Chopin, 1989a et modifié selon la procédure de Holo et Nes, 1989.

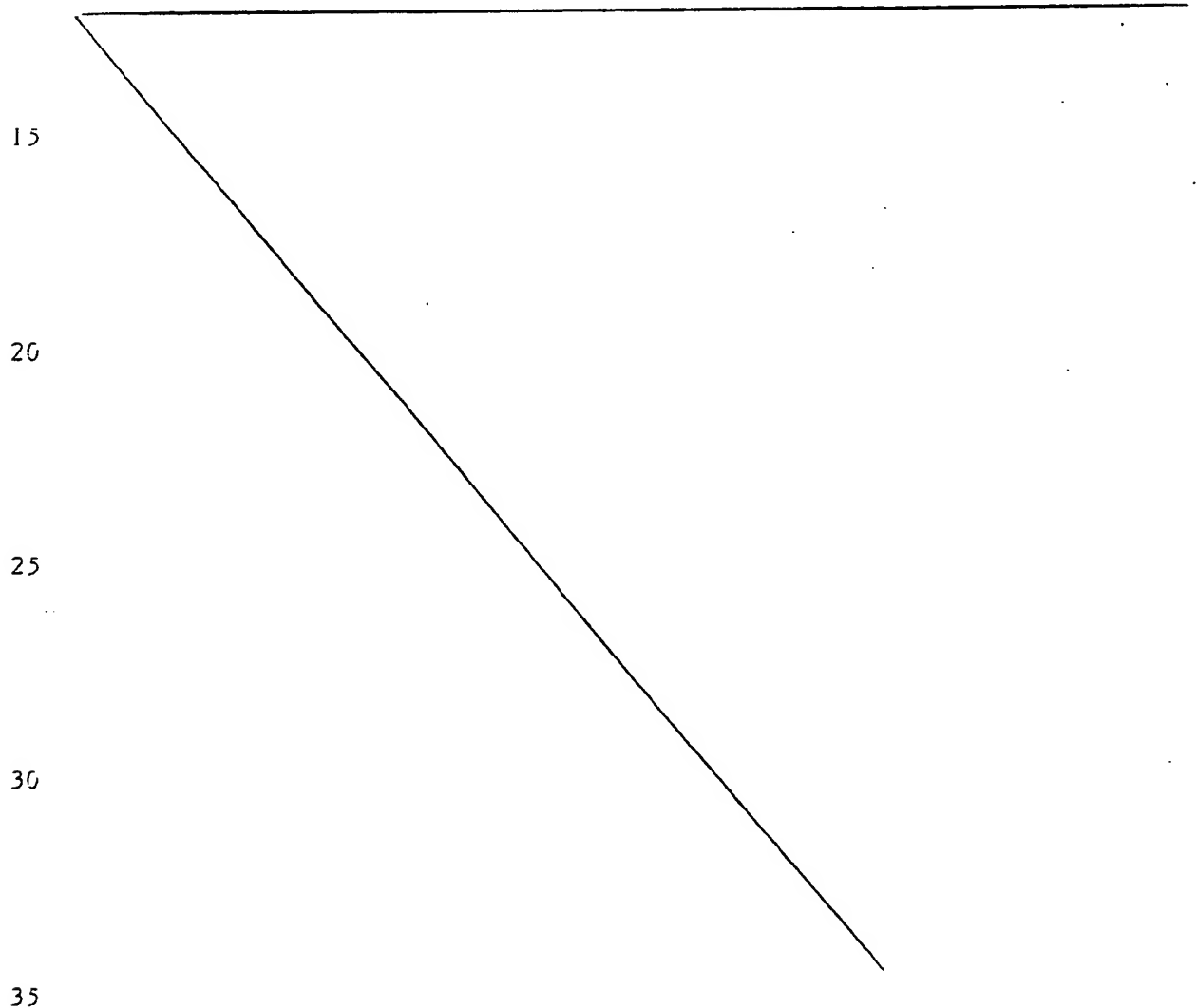


TABLEAU 1 : LISTE DES SOUCHES ET DES PLASMIDES

Souches ou plasmide	Marqueurs génétiques ou description	Origines ou référence
SOUCHES BACTERIENNES		
L. lactis :		
IL1403	Dépourvu de plasmide, R ⁻ M ⁻ , 2 prophages b1285 et b1286	Chopin et al, 1984
MGI363	Dépourvu de plasmide	Gasson, M.J. 1983
B. subtilis :		
SB202	trpC2, tyrA1, aroB2, hisH2, thyA	Laboratoire INRA
E. coli :		
DH5	F ⁻ endA1 recA1 hsdR17 (r _k ⁻ m _k ⁺) supE44 thi1 ⁻ gyrA96 relA1 ⁻	Hanahan, D. 1985

TABLEAU 1 : SUIITE

PLASMIDES		
pBluescript	Ap ^r M13-ori pBR322-ori	Stratagene
pGK12	Em ^r Cm ^r	Kok et al, 1984
pVE6004	frgt de 445bp de pBluescript et Frgt de 3340 bp Clal-HpaII de pVE6002 Em ^r	Présente invention
pVE6006	frgt de 445bp de pBluescript inséré dans le site Clal de pVE6002 Em ^r Cm ^r	Fig. 4
pVE6007	délétion Scal de 1175bp de pVE6006 Cm ^r	Présente invention
pVE6043	frgt SstI-Thal (ori +) de pGK12 frgt Thal-SstI (ORF A) de pVE6002 Em ^r Cm ^r	"
pVE6044	frgt SstI-Thal (ori +) de pVE6002 frgt Thal-SstI (ORF A) de pGK12 Em ^r Cm ^r	Fig. 2

Mutagenèse des plasmides.

La mutagenèse par hydroxylamine a été effectuée sur l'ADN du plasmide pGK12 dans les conditions décrites par Thomas, 1987. Après 110 et 120 minutes de traitement à 70° C, l'hydroxylamine est éliminé par précipitation du DNA à l'isopropanol.

Séquençage du DNA.

Pour le séquençage du DNA, on a cloné le fragment Thal (756pb)-RsaI (1620 pb) de pVE6002, dans le plasmide pBluescript. On génère une série de clones se recouvrant, par utilisation d'exonucléase III et de nucléase de haricots mung (Stratagène). Le fragment Thal (756pb)-NdeI (1140pb) de la préparation du plasmide pGK12 utilisé pour la mutagenèse est également séquencé par la même procédure.

On réalise le séquençage du DNA par la méthode de terminaison de chaînes didéoxy sur des ADN doubles brins avec le Kit de séquençage Taq Dye Primer Cycle (Applied Biosystem) en utilisant un appareil PCR Perkin Elmer. Les réactions de séquençage sont initiées avec des oligonucléotides fluorescents (Applied Biosystem) et sont analysées sur un séquenceur automatique (séquenceur 370 A DNA, Applied Biosystem). Les séquences obtenues ont été déterminées sur les deux brins.

RESULTATS

Isolement du mutant.

Le plasmide utilisé dans ces expériences, pGK12, est un dérivé de pWV01 contenant deux marqueurs de résistance aux antibiotiques (KoK et al, 1984). 10 µg d'ADN plasmidique sont mutagénisés in vitro par de l'hydroxylamine et introduits par électroporation dans la souche de lactococcus IL1403, après élimination de l'agent mutagène. L'efficacité de la mutagenèse est évaluée par la diminution de viabilité du plasmide et par l'apparition de mutants sensibles à l'érythromycine ou au chloramphénicol.

Après 110 à 120 minutes de traitement, la viabilité du plasmide chute à moins de 0,1 % et environ 10 % des transformants contiennent des plasmides sensibles à l'un des antibiotiques. Ces conditions de mutagenèse sont choisies pour rechercher des plasmides thermosensibles, identifiés par
5 réplique des transformants obtenus à 28° C sur un milieu contenant de l'érythromycine incubés à 37,5° C. Deux candidats thermosensibles, dénommés pVE6001 et pVE6002, sont obtenus par criblage d'environ 5000 clones. Leurs nombres de copies plasmidiques sont comparés, et la perte à 37,5° C est déterminée.

10 **Caractérisation du mutant : pVE6001 est un mutant non Ts.**

Le plasmide pVE6001 est plus instable que pGK12 à 28° C, et cette déficience devient plus prononcée à 37,5° C. Cependant, 7 % des bactéries contiennent encore le plasmide après 8 heures de croissance non
15 sélective à 37,5° C, ce qui suggère qu'une répllication a lieu dans les conditions restrictives (figure 1A, gauche).

Par rapport à pGK12, le nombre de copies de pVE6001 apparaît diminué à 28° C et 37,5° C, avec ou sans sélection (figure 1A), ce qui pourrait expliquer sa stabilité inférieure. Il est possible que la perte du
20 plasmide à des températures élevées, soit due à des changements physiologiques chez l'hôte à des températures supérieures, et non à la thermosensibilité du plasmide.

25 **Caractérisation du mutant : pVE6002 est un mutant thermosensible au dessus de 35° C.**

Les mesures de la stabilité du plasmide pendant la croissance sans antibiotique, révèlent que pVE6002 est aussi stable que pGK12 à 28° C, mais est perdu de façon drastique à 37,5° C (figure 1B). La perte rapide de
30 pVE6002 à 37,5° C suggère que la répllication est bloquée immédiatement après le changement de température. Après 8 heures de croissance, il ne reste qu'environ 0,1 % de cellules résistantes à l'érythromycine. Les

5 nombres de copies de pGK12 et de pVE6002 sont similaires à 28° C, avec et sans sélection ; cependant, après 5 heures à 37,5° C, pVE6002 est indétectable alors que le nombre de copies de pGK12 est à peu près le même (figure 1B). On peut conclure de ces expériences que la mutation sur pVE6002 constitue réellement une déficience thermosensible de réplication.

La température minimum permettant la perte de pVE6002 a été déterminée. La souche IL1403 contenant pVE6002 a été testée pour la perte plasmidique pendant 8 heures de croissance non sélective à 28° C, 30° C, 33° C, 35° C et 37,5° C (tableau 2).

TABLEAU 2 : Pourcentage de cellules Em^r dans la population

15	Temps (Heures)	Température de croissance				
		28° C	30° C	33° C	35° C	37,5° C
	0	100	100	100	100	100
	2	100	100	99	97	98
20	4	100	100	48	47	38
	6	100	100	9	3	4
	8	100	99	5	1	1

25 Une culture d'une nuit en M17 avec Em, de IL1403 portant pVE6002 est diluée dans du milieu sélectif neuf et mise à pousser 3 heures à 28° C. La culture est alors diluée 10.000 fois dans un milieu non-sélectif et incubée à différentes températures. A des intervalles de temps variés, des échantillons sont prélevés et placés sur M17 à 28° C. Pour chaque point de température et de temps, la perte du plasmide est évaluée en repiquant
30 une centaine de colonies sur des boîtes de milieu sélectif (Em) à 28° C.

On a trouvé que la perte plasmidique est équivalente à 37,5° C et 35° C. Une perte partielle du plasmide est déjà observée à 33° C, alors que le plasmide était stable à 28° C et 30° C. Ainsi, les cellules contenant pVE6002 peuvent perdre ce plasmide par élévation de la température à 35° C ou plus.

On a aussi introduit pVE6002 dans une autre souche de *Lactococcus*, MG1363 (Gasson, 1983), qui est distincte de IL1403 par comparaison des profils d'électrophorèse en champ pulsé. L'analyse des séquences indique que MG1363 est probablement une souche *L. lactis* subsp. *cremoris* (Godon et al, 1992). pVE6002 montre la même thermosensibilité dans cet environnement, démontrant que le phénotype du mutant plasmidique n'est pas lié à la souche.

Large spécificité d'hôte et phénotype Ts de pVE6002.

Un plasmide Ts peut être un véhicule de clonage utile dans d'autres organismes. Ainsi le comportement thermosensible de pVE6002 a été examiné chez *B. subtilis* et *E. coli*. Ces souches ont été choisies comme représentatives du large spectre d'hôte du réplicon original pWV01. L'ADN plasmidique a été introduit dans les deux espèces par transformation et sélection à 28° C. Etant donné que *B. subtilis* et *E. coli* ont des températures de croissance maximales supérieures à celles de *L. lactis* subsp., la réplication de pVE6002 a été testée à 28° C, 37° C et 42° C. Les résultats montrent que pVE6002 est thermosensible chez les deux hôtes. Il est probable que pVE6002 conserve ses propriétés de thermosensibilité chez le large spectre d'hôtes chez lequel il peut être établi.

Cartographie de la mutation Ts.

La séquence d'ADN de pWV01 montre la présence d'une origine-plus et de quatre ORF. Leenhouts déduit de sa similarité avec des ADN plasmidiques mieux caractérisés, que l'ORF A code pour la protéine de réplication (RepA) responsable de la coupure d'un brin d'ADN à

l'origine-plus. Des homologies supplémentaires suggèrent que l'ORF C pourrait réguler l'expression de RepA. Des fonctions n'ont pas encore été clairement attribuées à ORF B et ORF D, bien que l'on sache que cette dernière n'est pas nécessaire à la réplication.

5

Afin de localiser la mutation qui confère la thermosensibilité à pVE6002, on a construit des plasmides hybrides associant des parties du réplicon thermosensible et des parties non mutées. pVE6043 est constitué d'un fragment de pGK12 contenant l'origine-plus, ORF B et ORF C, et d'un
10 fragment pVE6002 (Ts) contenant l'ORF A (RepA) dépourvu de son promoteur, l'ORF D et les marqueurs de résistance à Em et Cm (on utilise les sites de restriction SacI et ThaI, figure 2). Cet hybride est perdu à 37,5° C, au même taux que pVE6002, alors que l'hybride réciproque (pVE6044) est maintenu avec la même stabilité que pGK12 (figure 2). Ainsi,
15 la mutation conférant la thermosensibilité à pVE6002 se trouve dans le fragment d'ADN codant pour RepA, ORF D et les marqueurs aux antibiotiques. Etant donné que l'ORF D n'est pas indispensable et que les marqueurs aux antibiotiques ne sont pas candidats, on peut conclure que la fonction thermosensible est la protéine RepA.

20

Données de séquençage.

Afin de localiser la mutation Ts, on a séquencé le fragment de 864 pb codant pour la protéine RepA de pVE6002. On a identifié quatre mutations, aux positions 972, 977, 980 et 987 (figure 3). On a confirmé que
25 la région correspondante du plasmide parental pGK12 qui a été utilisé pour la mutagenèse est identique à la séquence publiée pour pWV01 (Leenhouts et al, 1991). Les quatre mutations sont des transitions de G à A, correspondant à l'effet mutagène connu de l'hydroxylamine. Chaque changement de base a pour résultat une altération d'un acide aminé (figure
30 3) dont l'une, Val en Ile est conservative. La contribution d'une ou plusieurs de ces altérations peut être impliquée dans le phénotype Ts.

35

Dérivés du plasmide Ts.

Dans un but de clonage, des dérivés du plasmide Ts initial pVE6002 ont été développés (figure 4). Ces dérivés sont modifiés pour contenir soit les deux résistances aux antibiotiques (Em et Cm) soit
5 seulement l'une (Em ou Cm) et tous ont une séquence multisite dérivée du plasmide pBluescript SK+.

Excision du réplicon

Des évènements de double échange réciproque ont pu être
10 obtenus à partir d'un plasmide dérivé de pVE6002 portant une région d'homologie avec le chromosome bactérien interrompue par un gène de résistance à un antibiotique (Ab^r) comme illustré sur la figure 7a. Après introduction du plasmide dans la bactérie à 28° C, une première étape consiste à sélectionner les intégrants dans le chromosome par culture à 37°
15 C sur milieu contenant l'antibiotique. La région d'homologie est dupliquée à la suite de l'intégration (Figure 7a). Lors d'une seconde étape, on obtient l'excision du réplicon par incubation à 28° C pour permettre à la réplication plasmidique de reprendre et stimuler un second évènement de recombinaison. Les évènements d'excision sont sélectionnés par culture à
20 37° C ; le gène chromosomique est inactivé par le gène Ab^r .

Exemple 2 : Intégration du plasmide thermosensible dans le chromosome de *L. lactis*

25 Les souches bactériennes et les plasmides utilisés dans cette étude sont présentés au tableau 3. Les souches d'*Escherichia coli* sont cultivées dans du bouillon LB. *L. lactis* est cultivé et étalé sur un bouillon M17⁻glucose ou sur un milieu minimum quand il est testé pour le phénotype *ilv*. L'Erythromycine (Em) est ajouté à une concentration de 5 microgrammes/ml pour *L. lactis* subsp. *lactis* et 150 microgrammes/ml pour *E. coli*, la
30 tétracycline est utilisée à une concentration de 12,5 microgrammes/ml pour

L. lactis. L'électroporation de *L. lactis* subsp. *lactis* (Appl. Env. Microbiol. 55, 3119-3123, 1989) donne entre 10^5 et 10^6 transformants par microgramme d'ADN plasmidique pour IL1403 et environ 10^2 transformants par microgramme d'ADN plasmidique avec NCDO2118, la souche *ilv*⁺ utilisée pour les expériences de remplacement du gène. *E. coli* est transformée par la méthode décrite par Hanahan (1985, DNA cloning: A practical approach Vol 1: 109-135, IRL Press Ed Glover).

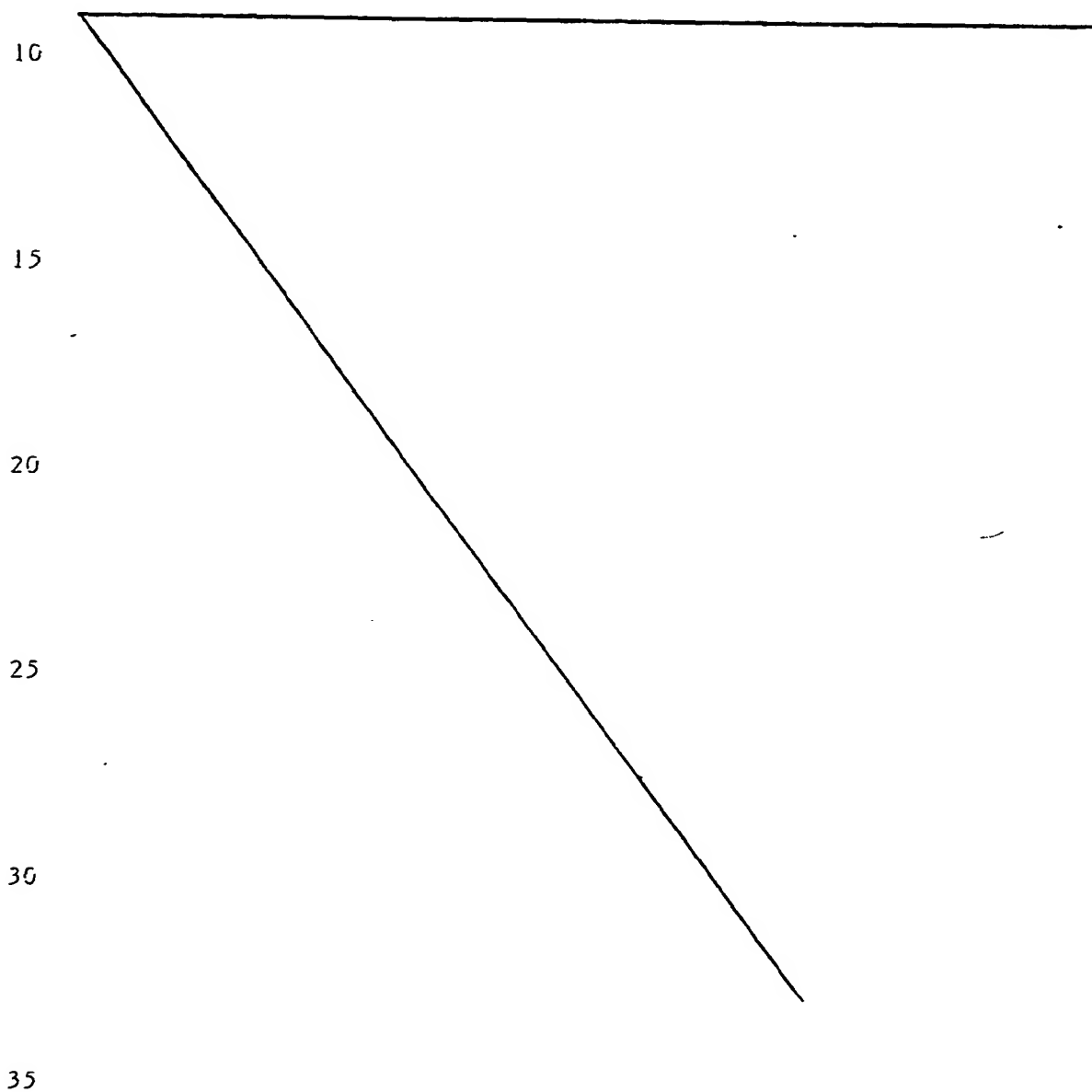


Tableau 3

5			
	SOUCHE	MARQUEURS GÉNÉTIQUES OU DESCRIPTION	SOURCE
	L. lactis :		
10	NCD02118	isolat naturel	*
	E. coli :		
	TG1	supE hsdΔ5 thi Δ(lac-proAB) F [traD36proAB+ lacI ^q lacZΔM15]	Sambrook et al
15			
	PLASMIDES		
	pG+host4	dérivé thermosensible de pGK12, Em ^r	**
	ou		
20	pV6004		
	pG+host5	frag. NsiI de pG+host4 lié au fragment 1,46 Kb Aval-AlwNI de pBR322 Em ^r	**
25	pVE7021 à pVE7034	produit de restriction SmaI-HindIII de pG+host5 lié à un fragment EcoRV-HindIII aléatoire du chromosome de IL1403	**
	pIL515	frag. EcoRI, ilv de 3,9 Kb de IL1403 dans pBluescript, Amp ^r	**
30			
	pVE7009	frag. EcoRI de de 3,9 Kb de pIL515 lié à pG+host5 coupé par EcoRI	**

Tableau 3 (suite)

5	pVE7009R	même construction que pVE7009, inséré dans l'orientation opposée	* *
	pVE7015	délétion SphI-EcoRV de pVE7009R laissant un frag. ilv de 3362 pb	* *
10	pVE7014	délétion StyI-EcoRV de pVE7009R laissant un frag. ilv de 2904 pb	* *
	pVE7010	délétion ClaI de pVE7009R laissant un frag. ilv de 2552 bp	* *
15	pVE7016	délétion XcmI-EcoRV de pVE7009R laissant un frag. ilv de 1912 bp	* *
	pVE7013	délétion AatII-EcoRV de pVE7009R laissant un frag. ilv de 1206 bp	* *
20	pVE7011	délétion HindIII de pVE7009R laissant un frag. ilv de 497 bp	* *
	pVE7012	délétion PstI de pVE7009R laissant un frag. ilv de 356 bp	* *
	pVE7017	délétion PflMI-EcoRV de pVE7009R laissant un frag. ilv de 330 bp	* *
30	pIL500	frag. 18,5 Kb XbaI ilv de NDCO2118 chromosome dans pIL253	Godon et al

Tableau 3 (suite)

5	pIL1202 frag. XbaI de pG+host4 contenant les extrémités XbaI-BglII de 1,1 Kb et EcoRI-XbaI de 2,5 Kb du frag. de 18,5 Kb de pIL500 lié au frag. BamHI de 4 Kb du gène Tet M
10	pIL1261 frag. 2,3 Kb XbaI-EcoRI de pIL500 interrompu par un gène Tet M, BamHI de 4 Kb inséré au site BglII et lié à XbaI-EcoRI pBluescript
15	pIL1263 XbaI-EcoRI pG+host4 lié au frag. XbaI-EcoRI de pIL1261 de 6,3 Kb

* : National Collection of Dairy Organisms

** : Présente invention

20

Construction des plasmides pour l'intégration

a) construction du vecteur

Le plasmide pG⁺host4 (ou pVE6004) est un dérivé Ts de pWVO1
5 préparé selon l'exemple 1. Pour faciliter le clonage chez E. coli, le
fragment de 1,4 Kb contenant l'origine de pBR322 est inséré dans
pG⁺host4. Le plasmide pG⁺host5 est construit par insertion du fragment Ava
I - Alw N I de pBR 322 (qui contient l'origine de réplication de pBR 322)
10 dans le pG⁺host4 linéarisé coupé par Nsi I. Sa structure est représentée sur
la figure 8. Le plasmide obtenu, appelé pG⁺host5 (Appligène, Illkirch,
France) est utilisé pour tous les clonages. L'activité de l'origine de pBR322
permet son maintien à 37° C chez E. coli et l'origine Ts maintient pG⁺host5
à 28° C dans les bactéries gram positif.

b) clonage de fragments chromosomiques

15 aléatoires dans pG⁺host 5.

L'ADN chromosomique de la souche IL1403 est digéré par
EcoRV et HindIII. Des fragments chromosomiques d'une taille comprise
entre 0,9 Kb et 1,4 Kb, sont purifiés à partir de gels d'agarose et liés avec
pG⁺host5 traité par SmaI-HindIII. Les plasmides recombinants sont établis
20 chez E. coli puis on les fait pénétrer par électroporation dans L. lactis.
Cette dernière est utilisée pour vérifier les structures des plasmides et les
tailles des inserts. Les résultats sont présentés dans le tableau 4 suivant.
On utilise les enzymes de restriction HpaI (site unique dans la partie du
vecteur) et HindIII (site unique entre l'insert et le vecteur) pour analyser
25 les intégrants. -

30

35

Tableau 4 : Ipc à différentes localisations sur le chromosome de *L. lactis*

5	Taille de l'insert plasmidique		IPC
	(Kb)		moyenne \pm SD
10	Groupe I :		
	pVE7025	1,29	$3,0 \pm 0,3 \times 10^{-2}$
	pVE7034	1,05	$3,8 \pm 0,5 \times 10^{-3}$
	pVE7021	1,29	$3,4 \pm 2,6 \times 10^{-3}$
15	pVE7024	0,96	$2,5 \pm 1,3 \times 10^{-3}$
	pVE7030	1,42	$2,3 \pm 0,8 \times 10^{-3}$
	pVE7028	1,46	$7,2 \pm 0,7 \times 10^{-4}$
	pVE7023	1,29	$6,6 \pm 3,9 \times 10^{-4}$
	pVE7022	1,08	$5,7 \pm 0,3 \times 10^{-4}$
20	pVE7027	1,05	$5,2 \pm 1,3 \times 10^{-4}$
	pVE7026	0,96	$4,0 \pm 0,5 \times 10^{-4}$
	Groupe II :		
25	pVE7029	1,02	$1,1 \pm 0,4 \times 10^{-5}$
	pVE7031	0,96	$9,9 \pm 3,9 \times 10^{-6}$
	pVE7032	1,37	$8,6 \pm 5,0 \times 10^{-7}$
	PVE7033	1,25	$3,9 \pm 0,9 \times 10^{-7}$
30			

ipc : fréquence d'intégrations par cellule

c) clonage et délétion d'un fragment d'opéron *ilv*

Un fragment *EcoRI* de 3949 bp de l'opéron *ilv* de IL1403 (J. Bacteriol 174, 6580-6589 (1992)) est cloné dans l'une ou l'autre orientation au site *EcoRI* de $pG^{+}host5$ (pour donner pVE7009 et pVE7009R).

5

Intégration par simple crossing-over (sco) dans le chromosome de *L. lactis*

Des souches de *Lactococcus* contenant les plasmides testés sont cultivées une nuit à 28° C en présence d'érythromycine, puis diluées 100 fois dans le même milieu et cultivées à 28° C pendant 2 heures à 2 heures 1/2 (phase exponentielle). Les cultures sont placées à 37,5° C pendant 3 heures afin de diminuer le nombre de copies de plasmides par cellule. Les échantillons sont ensuite dilués et étalés à 37° C sur milieu M17 Em afin de détecter les événements d'intégration, et à 28° C sur milieu non sélectif pour déterminer le nombre de cellules viables. La fréquence d'intégration par cellule (ipc) est estimée comme étant le rapport des cellules Em^{r} à 37° C, sur le nombre de cellules viables à 28° C. Les intégrants isolés à 37° C sont maintenus dans un milieu M17 contenant Em, à 37,5° C pour un usage ultérieur.

15

Intégration par double crossing-over (dco) dans le chromosome de *L. lactis*

20

Les plasmides pIL1263 et pIL1202, sont composés du vecteur Ts ($pG^{+}host4$, Em^{r}) et respectivement des régions chromosomiques de 2,3 Kb ou 3,6 Kb, interrompues par le gène Tet de Tn1545 (Nucl. Acids Res., 14, 7047-7058, 1986). Une souche portant pIL1202 ou pIL1263 est cultivée une nuit à 37,5° C dans M17 avec Tet ou Em pour obtenir une population d'intégrants. La culture est ensuite diluée à $1/10^5$ dans du milieu M17 sans antibiotique et portée à 28° C pour stimuler la recombinaison par réplication plasmidique. Une culture de 12 heures ou plus à 28° C donne des fréquences maximales de remplacement du gène. Une culture d'une nuit à 28° C est étalée à différentes concentrations cellulaires à 37° C avec ou sans sélection par Tet. Les colonies dans lesquelles le remplacement du gène s'est produit ont un phénotype Tet^r et Em sensible (Em^s).

25

30

35

L'ADN chromosomique est préparé selon des méthodes connues (Grüss et al, 1988)

L'ADN purifié est traité par des enzymes de restriction, séparé par électrophorèse en gel d'agarose et analysé par hybridation de Southern avec des sondes d'ADN pour détecter les recombinaisons homologues (Sambrook et al, 1989).

Résultats

1) Intégration par simple crossing-over

Le clonage des fragments chromosomiques de *L. lactis* dans pG⁺host5 chez *E. coli* permet d'isoler 14 plasmides différents contenant chacun une insertion chromosomique distincte, de 0,9 Kb à 1,4 Kb. Ces plasmides établis dans IL1403 à 28° C, servent à mesurer les fréquences d'intégration dans le chromosome de *L. lactis*. La fréquence d'intégration par cellule est comprise entre 10⁻² et 10⁻⁷. L'ipc d'un vecteur pG⁺host5 sans insert chromosomique est compris entre 10⁻⁶ et 10⁻⁷. Les plasmides portant les inserts chromosomiques peuvent être classés en deux groupes en fonction de leur fréquence d'intégration. Dans le groupe I, l'ipc varie entre 3.10⁻² et 4.10⁻⁴. Ces variations doivent être dues à la localisation ou à la nature de l'insert plutôt qu'à sa taille. Dans le groupe II, l'ipc du plasmide est comprise entre 10⁻⁵ et 3.10⁻⁷. Ceci est probablement dû à l'interruption d'un gène chromosomique essentiel, qui ne permet d'observer que les intégrations non homologues. Seuls deux de ces plasmides (pVE7028 et pVE7034) produisent des molécules de hauts poids moléculaires (HMW). L'analyse de l'ADN chromosomique obtenu à partir des souches intégrantes maintenues à 37° C, par restriction enzymatique et hybridation de Southern en utilisant le plasmide pG⁺host5 comme sonde, indique une intégration simple et multi-tandems dans le cas de huit plasmides et une intégration par copies multiples dans le cas de deux plasmides. La digestion par HindIII de l'ADN des intégrants confirme que l'intégration se produit par simple crossing-over. Chaque plasmide contient un seul site HindIII à la jonction vecteur-insert, et la digestion doit libérer une bande unique d'ADN de taille plasmidique.

L'hybridation de Southern de l'ADN total non digéré ne révèle pas de plasmide libre dans aucun des plasmides du groupe I, ce qui indique que la copie du plasmide est intégrée. Une analyse similaire des plasmides pVE7028 et pVE7034 confirme que ces plasmides sont également intégrés
5 par simple crossing-over. L'utilisation d'HpaI, qui reconnaît un site unique à l'intérieur du vecteur, permet de déterminer que chaque plasmide est intégré à une position distincte.

Les quatre plasmides du groupe II (faible fréquence d'intégration), paraissent être intégrés au hasard, car la digestion par HindIII ne
10 libère pas une bande monomérique de plasmide, et la digestion par HpaI de trois intégrants du même plasmide ne donne pas le même profil sur le gel. La carte de restriction du chromosome de *L. lactis* développé pour SmaI et ApaI permet de localiser les sites d'intégration des plasmides par simple crossing-over sur la carte chromosomique. Chaque intégrant est présent sur
15 un segment différent. L'ensemble de ces résultats indique que les insertions chromosomiques sont positionnées de façon aléatoire sur le chromosome, excluant ainsi tout biais dans la procédure.

La fréquence d'intégration dépend de la longueur de l'homologie.

20 Un segment de 3,9 Kb de l'opéron *ilv* de IL1493 séquencé, est cloné dans pG⁺host5, et un ensemble de délétions du fragment est généré sur le même vecteur. Alors que des plasmides portant l'insert total de 3,9 Kb dans l'une des deux orientations (pVE7009 et pVE7009R) présentent une certaine instabilité structurelle dans *L. lactis*, les huit dérivés par délétion
25 de pVE7009R sont stables. Ces clones sont utilisés pour étudier la relation entre la longueur de l'homologie et la fréquence d'intégration. Il existe une relation logarithmique entre la fréquence d'intégration et la longueur d'homologie pour des longueurs comprises entre 0,35 et 2,5 Kb. Pour des fragments de plus de 2,5 Kb, les fréquences de recombinaison paraissent
30 atteindre un plateau, car les ipc des segments homologues de 2,5, 3,3 et 3,9 Kb ne sont pas significativement différents. Les facteurs autres que la longueur apparaissent aussi être importants. L'analyse par des enzymes de

restriction qui reconnaissent un site unique soit dans le vecteur, soit dans l'insert, soit dans la jonction vecteur-insert, confirme que l'intégration se produit par recombinaison homologue par simple crossing-over. Pour chaque plasmide utilisé, des intégrations multicopies du plasmide se produisent. Ces résultats montrent que pG^+ host fournit un moyen d'intégration efficace par simple crossing-over s'il porte des segments homologues aussi petits que 330 paires de bases.

2) intégration par double crossing-over

Dans le système par simple crossing-over (sco) décrit ci-dessus, le plasmide intégré est flanqué de séquences répétées. Aussi, quand les souches intégrantes, générées à 37° C, sont placées à 28° C, la réplication du plasmide stimule fortement un second événement de recombinaison. Cet événement a pour conséquence une haute fréquence d'excision du réplicon, conduisant soit à la structure parentale, soit à la structure chromosomique dco (double crossing-over).

Une souche faiblement transformable de *L. lactis*, NCDO2118, qui est prototrophe pour les acides aminés ramifiés (Ile, Leu, Val) et dans laquelle aucune modification génétique n'était réalisable jusqu'à présent, est utilisée. Deux dérivés de pG^+ host4 qui portent un segment chromosomique soit contigu, soit non contigu sont utilisés. pIL1263 contient un fragment chromosomique de 2,3 Kb, en amont de l'opéron *ilv*, interrompu par un segment d'ADN de 4 Kb contenant un marqueur de résistance à la tétracycline (Tet^r). La substitution du gène doit conduire à l'insertion du marqueur Tet^r dans le chromosome et laisser l'opéron *ilv*⁺ intact. Le plasmide pIL1202 contient des segments non contigus de 1,1 Kb et 2,5 Kb, correspondant aux extrémités d'une région de 18,5 Kb, incluant l'opéron *ilv*, relié par le marqueur Tet^r de 4 Kb. Le remplacement du gène doit conduire à une délétion du chromosome de 14,9 Kb incluant l'opéron *ilv* et donnant un phénotype *ilv*⁻.

Sélection du gène de remplacement : une souche contenant soit pIL1202 soit pIL1263 est cultivée dans des conditions indiquées ci-dessus, en utilisant Tet comme marqueur de sélection. Dans des expériences indépendantes avec pIL1263, 69% et 98% des colonies Tet^r étaient Em^s ;
5 avec pIL1202 50% et 91% des colonies Tet^r sont Em^s. Dans les cultures de contrôle maintenues à 37° C pendant la même période, toutes les colonies Tet^r sont également Em^r. Ce résultat indique que la réplication dans les plasmides rc (à réplication circulaire) stimule l'excision à partir du chromosome. Cinq colonies Em^s obtenues par intégration de pIL1202 sont
10 cultivées sur milieu minimum dépourvu d'acides aminés ramifiés et sont ilv⁻, ce qui confirme que la recombinaison a eu lieu. La structure de la région chromosomique correspondante des cinq isolats Tet^r Em^s est étudiée par hybridation de Southern, qui confirme le remplacement du gène dans tous les cas.

15 Pas de sélection : un protocole identique a été utilisé sans sélection par Tet, afin de se placer dans le cas où le fragment chromosomique porté par le plasmide n'a pas de marqueur de sélection. Dans trois expériences utilisant pIL1263 (insertion de gène), 10% à 40% des colonies obtenues à 37° C sans sélection sont Tet^r Em^s, ce qui indique qu'un événement de
20 remplacement du gène a eu lieu. Pour pIL1202 (délétion du chromosome) 1% à 7% des colonies sont Tet^r Em^s, ce qui indique un remplacement du gène ; parmi les quatre colonies Tet^r Em^s testées, toutes sont ilv⁻. L'analyse de la structure chromosomique des quatre intégrants par dco de chaque type confirme que le remplacement se produit sans sélection d'un
25 nouveau fragment inséré. Ces résultats démontrent la faisabilité du remplacement de gène sans laisser un marqueur antibiotique dans le chromosome. Ce protocole est donc adapté pour la modification chromosomique sans utilisation de marqueurs de sélection.

Utilisation du pG⁺host dans d'autres bactéries gram positif

30 L'efficacité de recombinaison intermoléculaire dans douze localisations différentes du chromosome de *B. subtilis* a été déterminée en

transformant des cellules compétantes par un plasmide non répliatif (J. Bacteriol. 174, 5593-5587, 1992). Dans ces expériences, le segment homologue est invariant (insertion d'un fragment de pBR322). Les efficacités varient d'environ trois fois en fonction de la position de l'intégration. En utilisant le système pG⁺host sco plutôt que le vecteur non répliatif, des expériences de recombinaison identique peuvent être effectuées sur les deux souches de B. subtilis avec les différences d'un ordre de trois dans les fréquences d'intégration. pG⁺host5 portant le fragment de 1,4 Kb de pBR322 est introduit dans les souches de B. subtilis d'intérêt. En utilisant la procédure sco décrite ci-dessus, la fréquence d'intégration varie entre $1,8 \pm 0,6.10^{-3}$ et $6,1 \pm 0,9.10^{-4}$. Les mêmes variations de trois fois sont observées entre les deux différentes localisations que celles obtenues avec le système non répliatif. Ce résultat démontre l'efficacité du système.

Exemple 3 : Modification génétique d'organismes non-transformables

Des organismes d'intérêt industriel tels que certains lactobacilles ne sont actuellement pas transformables, il est cependant possible d'y introduire des plasmides par conjugaison. Le locus de mobilisation oriT du plasmide pIP501 a été caractérisé. pIP501 est autotransférable dans certains de ces lactobacilles.

Ce fragment oriT a été cloné dans le plasmide Ts (plasmide Ts:oriT) ; sa capacité à être mobilisé en présence d'un plasmide "helper" (dérivé de pIP501) qui fournit les protéines de transfert en trans a été testée. Plusieurs croisements intra- ou inter-espèces ont été réalisés avec succès (Tableau 5) ; avec les exconjugants qui ne contiennent que le plasmide Ts:oriT, le procédé à venir d'intégration par recombinaison est applicable. On peut donc introduire des informations génétiques dans le chromosome de Lactobacillus bulgaricus espèce non-transformable de plus en plus utilisée par l'industrie laitière.

La finalité du procédé d'intégration par recombinaison est la modification des caractères génétiques de souches bactériennes, cela suppose que les propriétés à modifier soient caractérisés au niveau moléculaire. Le développement d'un système de transposition fonctionnel
5 (combinaison du plasmide Ts d'un transposon) constituerait un apport appréciable en tant qu'outil génétique pour l'analyse de *L. lactis*.

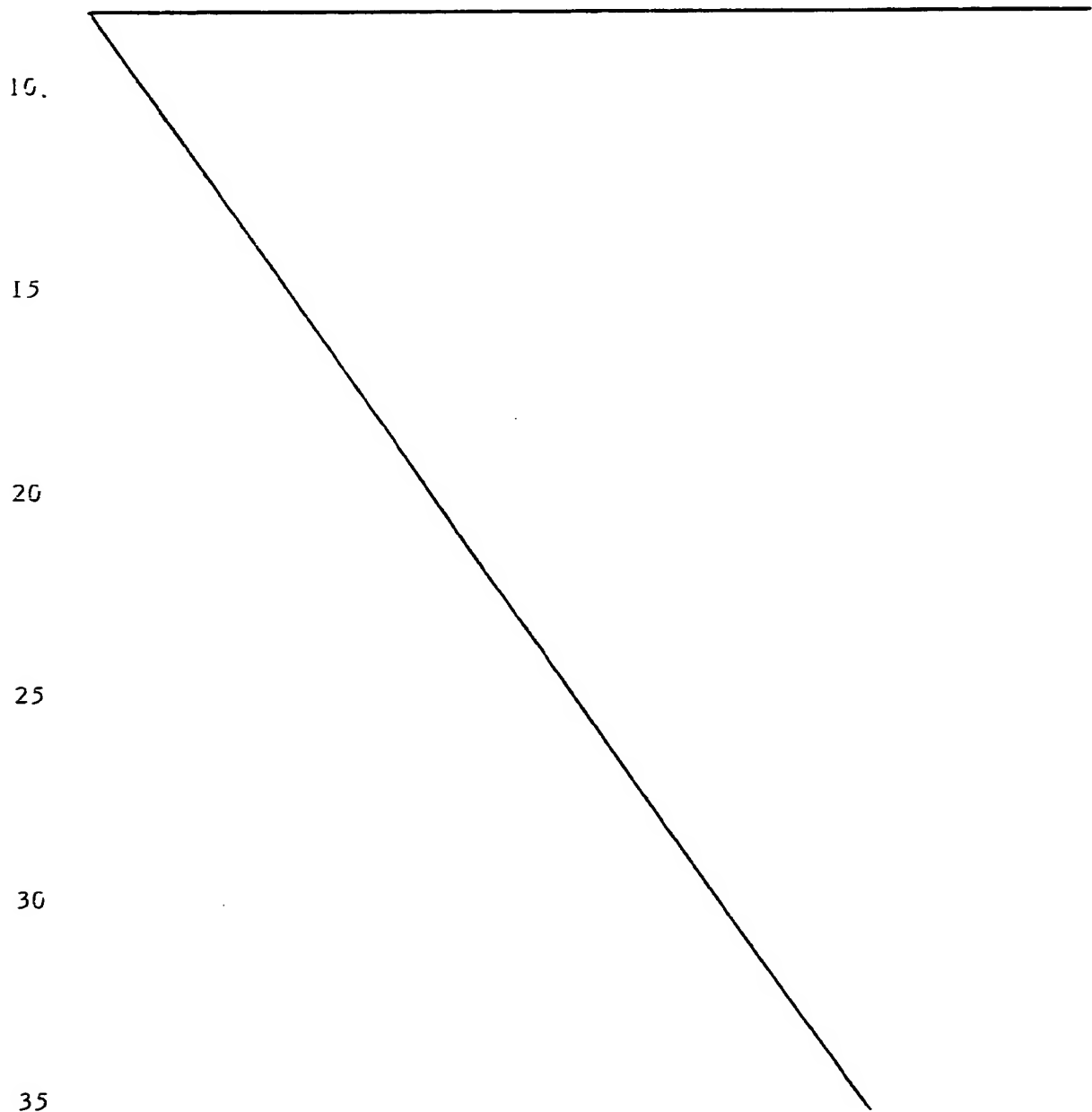


Tableau 5 : FREQUENCE DE CONJUGAISON AVEC LE PLASMIDE TS:oriT

5

	Donneuse	L. lactis IL1403/pHelper/pTs:oriT
	Receveuse	
10	L. lactis IL1403 str ^r	5.10^{-3} exc/don *
15	E. faecalis IL1885 str ^r	10^{-5} exc/don
	L. bulgaricus IL1687 str ^r	3.10^{-5} exc/don
20	S. sanguis IL1474 str ^r	3.10^{-7} exc/don

25 * exc/don : Nombre d'exconjugants contenant le Ts:oriT par cellule
donneuse

Exemple 4 : utilisation d'un plasmide thermosensible comme vecteur
d'un transposon

Une cassette de transposition Tn10 clonée dans un dérivé de pVE6004 est utilisée pour un test de transposition. Environ 1% des cellules
5 sont Em^r à 37° C, ce qui indique que le transposon ou le plasmide est
intégrés dans le chromosome. L'intégration non spécifique du plasmide sans
la cassette de transposition se produit à des fréquences inférieures à 10⁻⁷.
La transposition est estimée par analyse de l'ADN digéré par HindIII à
partir de huit colonies. HindIII a deux sites de restriction dans le plasmide,
10 mais aucun dans l'unité transposable. L'ADN chromosomique est extrait de
huit clones thermorésistants Em^r et digéré avec HindIII ; l'ADN traité est
ensuite séparé par électrophorèse en gel d'agarose et hybridé avec un
fragment d'ADN contenant le transposon Em^r comme sonde. Dans ces
conditions, l'intégration du vecteur entier (c'est-à-dire sans transposition)
15 conduirait à une bande d'hybridation de 1,3 Kb, qui n'est pas observée ici.
Chaque échantillon chromosomique donne un profil unique quand le
fragment d'ADN contenant le transposon est utilisé comme sonde. Aucune
des bandes hybridées n'a une taille de 1,3 Kb, qui serait attendue si le
plasmide entier était intégré dans un site du vecteur. En outre, on
20 n'observe pas d'hybridation quand le plasmide vecteur Ts est utilisé comme
sonde. Ces résultats indiquent que la transposition a lieu à différents sites
et que l'ADN plasmidique ne s'intègre pas dans le chromosome avec le
transposon. Le plasmide thermosensible peut donc être utilisé comme
vecteur de livraison.

25

30

35

LEGENDE DES FIGURESFIGURE 4 :

5 Unique sites :
AccI *KpnI*
BamHI *NotI*
BstXI *PstI*
DraI *SalI*
10 *EagI* *SacI*
EcoRI *SmaI*
EcoRV *SpeI*
HindIII *XbaI*
XhoI

FIGURE 6 :symboles :








20  : gène chromosomique actif
 : région d'homologie entre le plasmide et le chromosome
Ab^r : résistance à un antibiotique
 : événement de recombinaison

FIGURE 7A :symboles


30  : gène chromosomique actif
  : régions d'homologie entre le plasmide et le chromosome
Tet^r : résistance à la tétracycline (d'autres marqueurs peuvent être utilisés)
Em^r : résistance à l'érythromycine
35  : événement de recombinaison

LEGENDE DES FIGURESFIGURE 7B :

5

symboles :

10

 : gène chromosomique actif : région d'homologie entre le plasmide et le chromosome : duplication plasmidique Ab^r : résistance à un antibiotique : événement de recombinaison

15

20

25

30

35

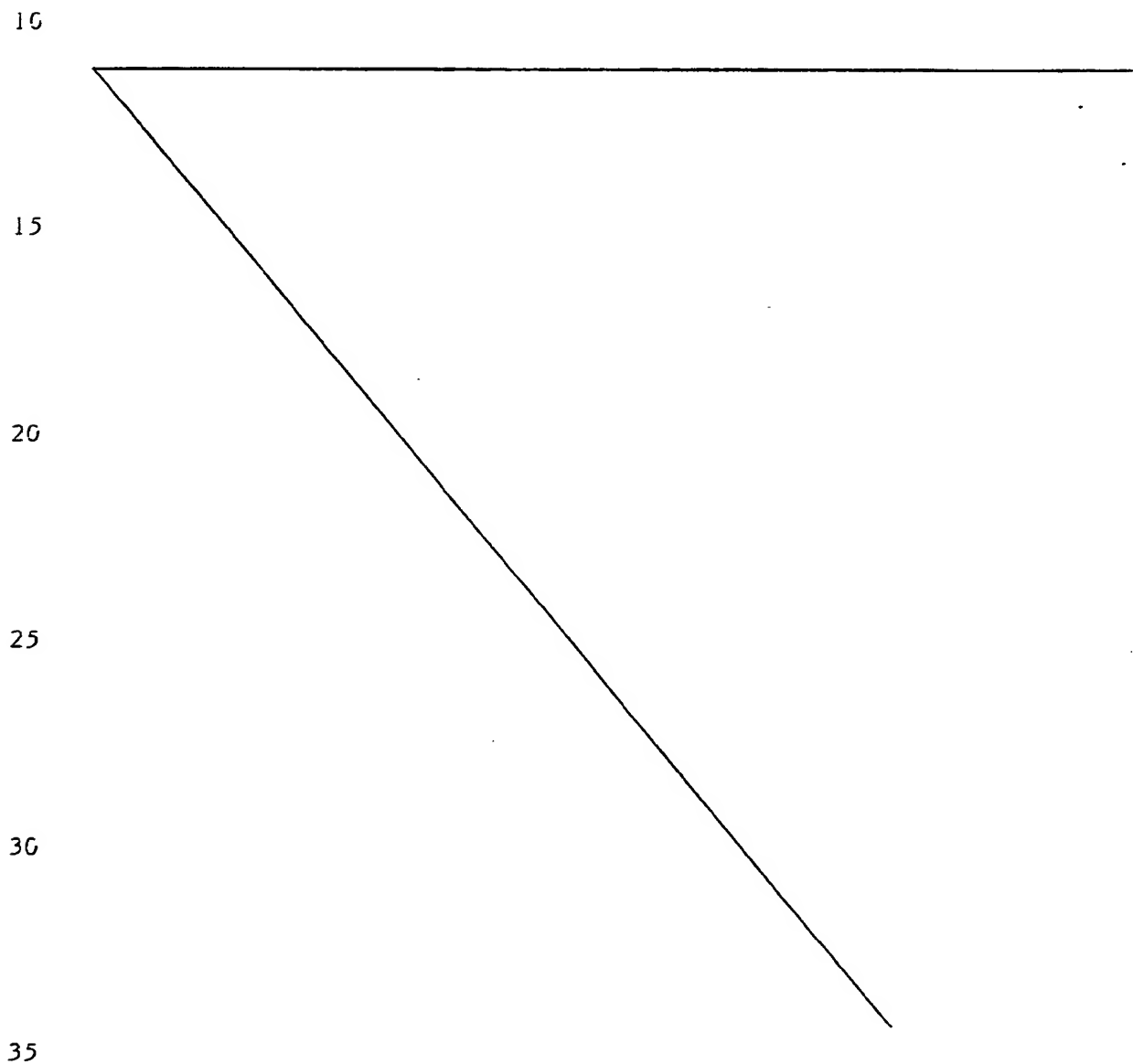
REFERENCES

- 5 Chopin, A., MC. Chopin, A. Moillo-Batt, and P. Langella. 1984. Plasmid 11:
260-263.
- Gasson, M.J. 1983. J. Bacteriol. 154: 1-9.
- 10 Godon, J-J., C., Delorme, P., Renault and S. D. Ehrlich. 1992. Appl. Env.
Microbiol. submitted.
- Godon, JJ., MC. Chopin and S.D. Ehrlich. 1992. J. Bacteriol. 174 :
6580-6589.
- 15 Grüss, A., and S.D. Ehrlich. 1988. J. Bacteriol, 170 : 1183-1190
- Hanahan, D. 1985. In DNA cloning: A practical approach Vol 1: 109-135. IRL
Press Ed Glover.
- 20 Holo, H, and Nes, I, F. 1989. Appl. Env. Microbiol. 55: 3119-3123.
- Kok, J., J.M.B. van der Vossen and G. Venema. 1984. Appl. Env. Microbiol.
48: 726-731.
- 25 Langella, P., and Chopin, A. 1989. FEMS Microbiol. Lett. 89: 301-306.
- Leenhouts, K., J., B., Tolner, S., Bron, J., Kok, G., Venema and J., F.M.L.
Seegers. 1991. Plasmid. 26: 55-66.
- 30 Niaudet, B; Ehrlich, S, D. 1979. Plasmid. 2: 48-58.

Petit, MA., Mesas, M., J., Noirot, P., and Ehrlich, S., D. 1992. Inducible Amplification in the Bacterial Chromosome. submitted.

Sambrook J., F Fritsh, and T., E. Maniatis.1989. Molecular cloning: a
5 laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

Thomas C.M. 1987. In Plasmids. A practical approach. IRL Press EDS Hardy.



REVENDICATIONS

1. Plasmide vecteur bactérien du type comportant une origine de réplication efficace dans les bactéries gram positives, caractérisé en ce qu'il comporte au moins :
- un gène marqueur qui s'exprime dans une souche hôte bactérienne,
 - un système de réplication efficace qui est thermosensible à partir d'une température compatible avec la viabilité de la souche hôte,
- et en ce que la température d'inhibition de réplication est inférieure ou égale à environ 37° C.
2. Plasmide selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il possède un système de réplication efficace dans les bactéries choisies dans le groupe comprenant : Bacillus, Enterococcus, Lactobacillus, Lactococcus, Streptococcus, Listeria, Pediococcus, Staphylococcus, Clostridia, Leuconostoc, E. coli.
3. Plasmide vecteur selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisé en ce qu'il comporte en outre au moins une séquence d'ADN homologue avec une séquence d'ADN chromosomique, afin de permettre une recombinaison.
4. Plasmide vecteur selon la revendication 3, caractérisé en ce que le gène marqueur est situé de façon à être intégré dans le chromosome en cas de recombinaison.
5. Plasmide vecteur selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que le gène marqueur assure une résistance à un composé chimique ou est un gène permettant la complémentation d'une auxotrophie.
6. Plasmide vecteur selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que le système de réplication thermosensible est inhibé au-dessus d'environ 35 ° C.
7. Plasmide vecteur selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que le plasmide comporte un locus de mobilisation permettant la conjugaison.
8. Plasmide vecteur selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'il comporte deux séquences identiques répétées, encadrant une séquence du plasmide.

9. Plasmide vecteur selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que le système de répllication est celui porté par le plus grand fragment ClaI du plasmide pWV01, présentant au moins une mutation dans la région Thal-RsaI.

5 10. Plasmide selon la revendication 9, caractérisé en ce qu'il présente au moins une mutation dans la région correspondant à Rep A du plasmide pWV01.

10 11. Plasmide selon l'une des revendications 9 et 10, caractérisé en ce que, par rapport à la séquence de pWV01, il présente au moins une mutation dans l'une des positions suivantes : 972, 977, 985, 987.

12. Plasmide selon l'une des revendications 9 à 11, caractérisé en ce que le fragment correspondant au système de répllication code pour une protéine présentant les mutations représentées sur la figure 3.

15 13. Plasmide selon l'une des revendications 1 à 12, caractérisé en ce qu'il comporte une des séquences représentées sur la figure 9, 10 ou 11, ou une séquence présentant au moins 80% d'homologie avec ces séquences.

20 14. Plasmide selon l'une des revendications 9 à 13, caractérisé en ce qu'il est répllicatif à 28° C, et non-répllicatif à une température supérieure à environ 35° C.

15. Plasmide selon l'une des revendications 7 à 14, caractérisé en ce que le locus de mobilisation est le locus ori T, extrait d'un plasmide de bactérie à gram positif.

25 16. Plasmide selon l'une des revendications 7 à 17, caractérisé en ce qu'il comporte en outre un réplicon actif chez E. coli, qui en fait un plasmide navette gram-négatif, gram-positif.

17. Plasmide selon l'une des revendications 1 à 16, caractérisé en ce qu'il porte un transposon.

30 18. Plasmide selon l'une des revendications 1 à 17, caractérisé en ce qu'il comporte en outre un gène codant pour une protéine d'intérêt, sous le contrôle des éléments nécessaires à son expression.

19. Bactérie caractérisée en ce qu'elle contient un plasmide selon l'une des revendications 1 à 18, sous forme libre ou intégré dans son chromosome.

5 20. Procédé d'inactivation d'un gène présent dans le chromosome d'une bactérie, caractérisé en ce que :

- a) on introduit dans la bactérie, par transformation, le plasmide selon l'une des revendications 1 à 6, 8 à 14, 16, 17 ou 18.
- b) on cultive la bactérie sur milieu sélectif à une température inférieure à la température d'inhibition de l'origine de réplication,
- 10 c) on élève la température de culture à une température supérieure à ladite température d'inhibition,
- d) on récupère les bactéries survivantes après plusieurs cycles de multiplication.

15 21. Procédé d'inactivation d'un gène dans une bactérie, caractérisé en ce que :

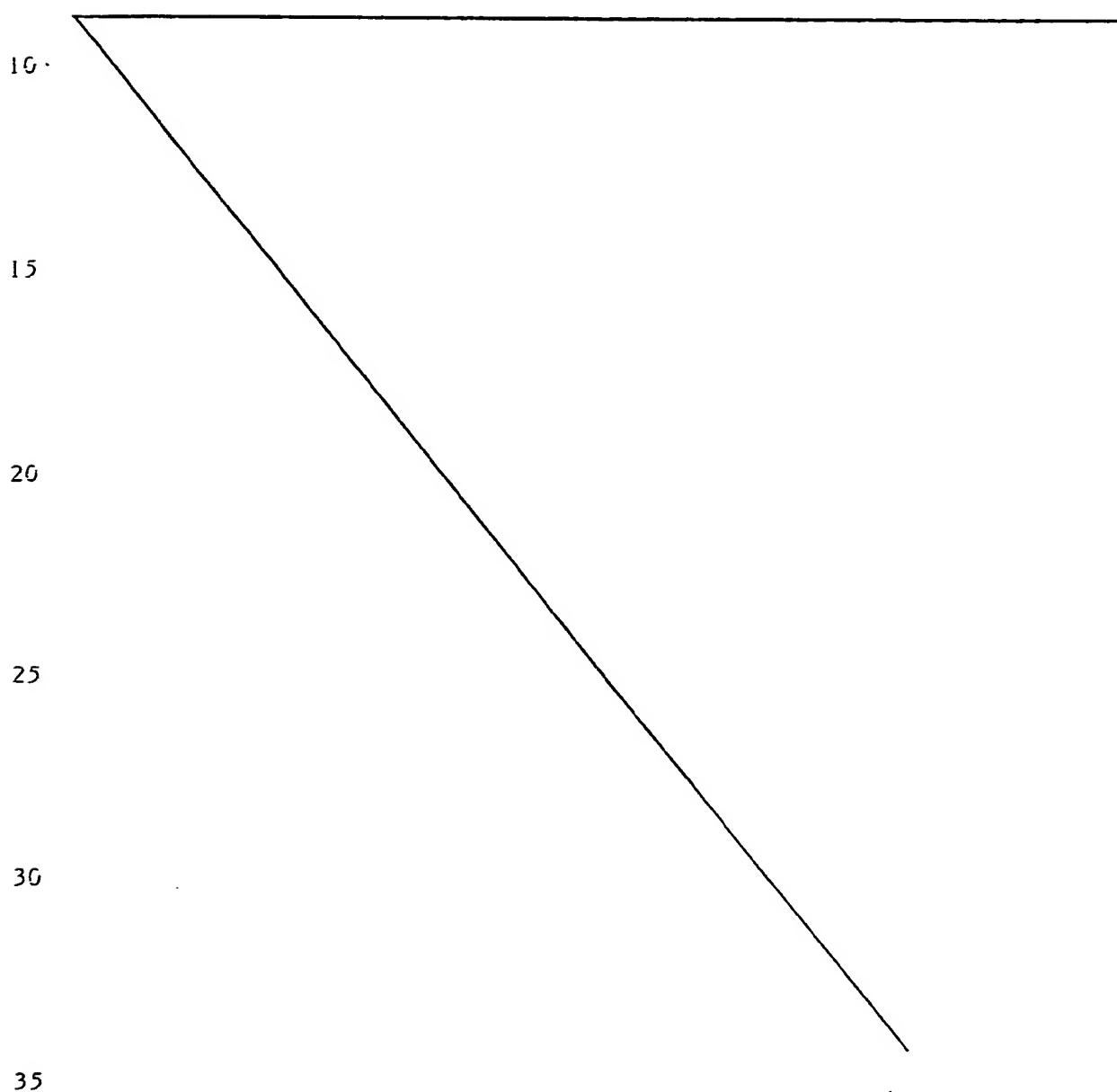
- a) on introduit dans la bactérie, par conjugaison, un plasmide selon l'une des revendications 7 à 18,
- b) on cultive la bactérie sur milieu sélectif à une température inférieure à la température d'inhibition de l'origine de réplication,
- 20 c) on élève la température de culture à une température supérieure à ladite température d'inhibition,
- d) on récupère les bactéries survivantes après plusieurs cycles de multiplication.

25 22. Procédé d'introduction d'un gène hétérologue dans une bactérie, caractérisé en ce que :

- a) on introduit dans la bactérie, par transformation ou conjugaison un plasmide selon la revendication 18,
- b) on cultive la bactérie sur milieu sélectif à une température inférieure à la température d'inhibition de l'origine de réplication.
- 30 c) on élève la température de culture à une température supérieure à ladite température d'inhibition,
- d) on récupère les bactéries survivantes après plusieurs cycles de multiplication.

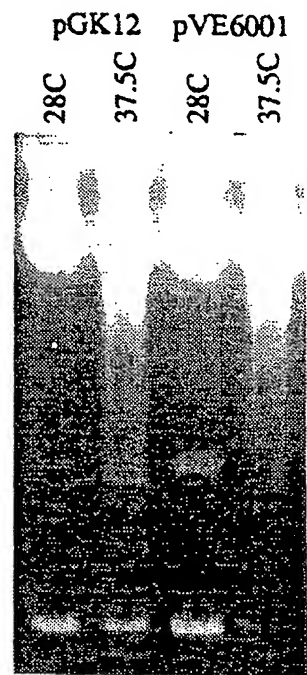
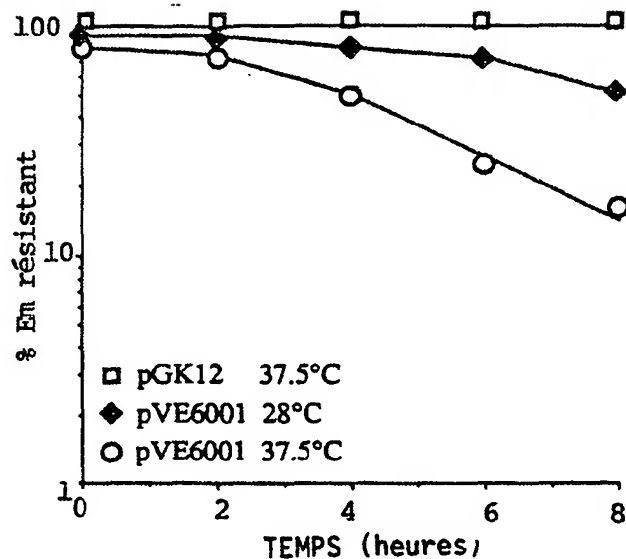
23. Procédé selon l'une des revendications 20 à 22, caractérisé en ce que les bactéries survivantes obtenues à l'issue de l'étape d), sont à nouveau mises en culture à une température inférieure à la température d'inhibition de l'origine de répllication, sur milieu non sélectif.

5 24. Procédé selon l'une des revendications 20 à 23, caractérisé en ce que l'étape b) est réalisée à une température d'environ 28°C.



1/21

1-A



1-B

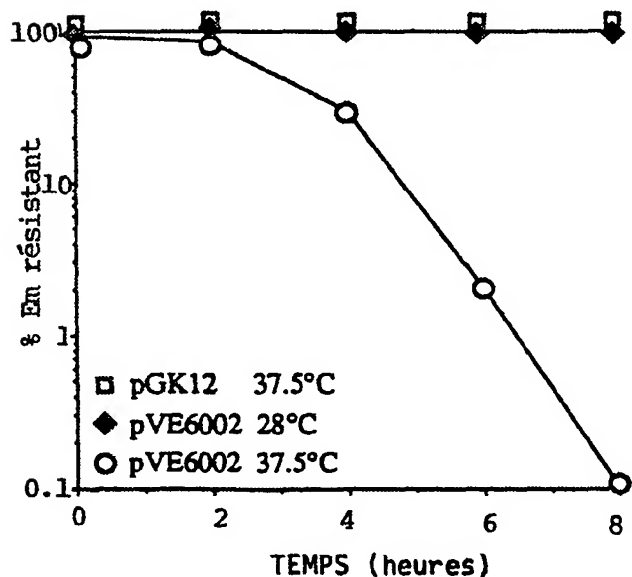
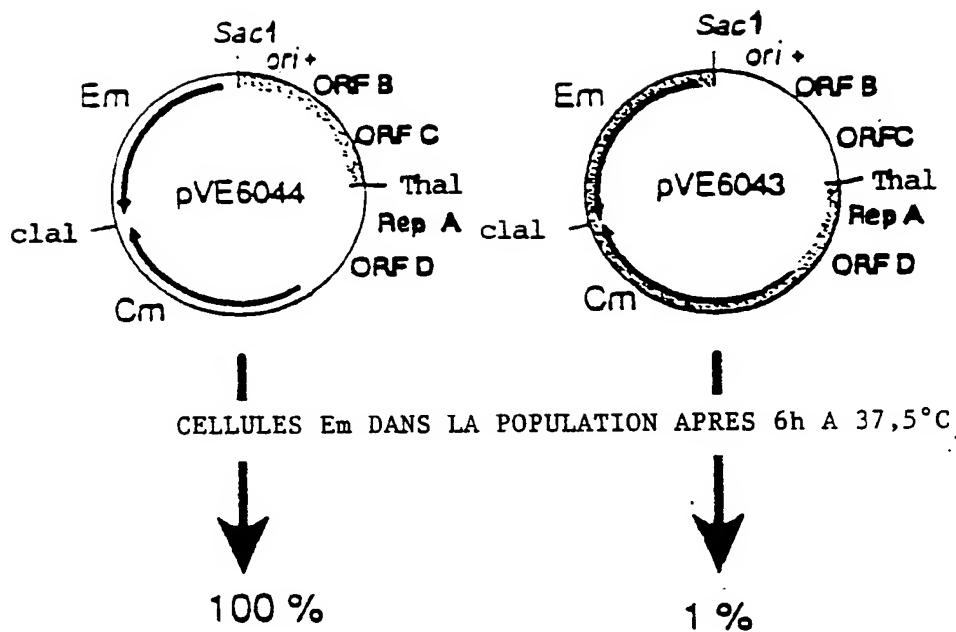
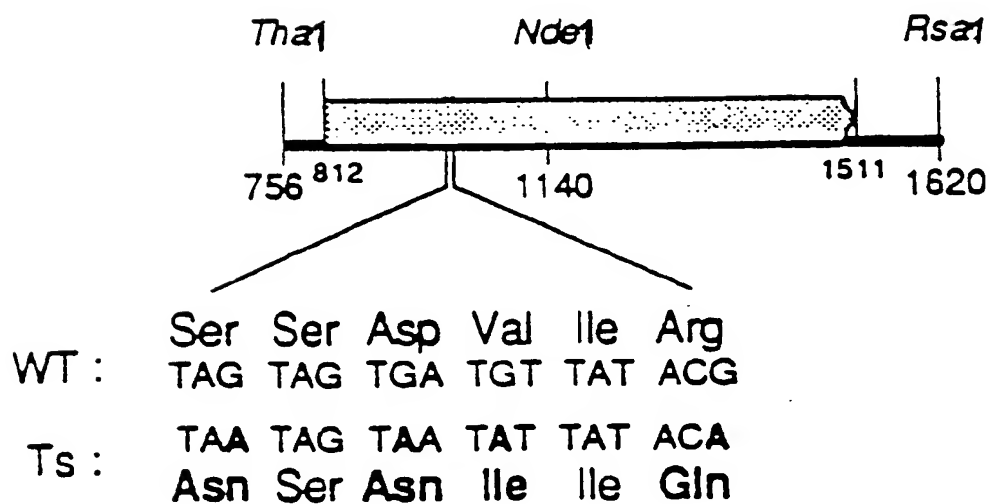


FIGURE 1

FEUILLE DE REMPLACEMENT

2/21

FIG.2FIG.3

3/21

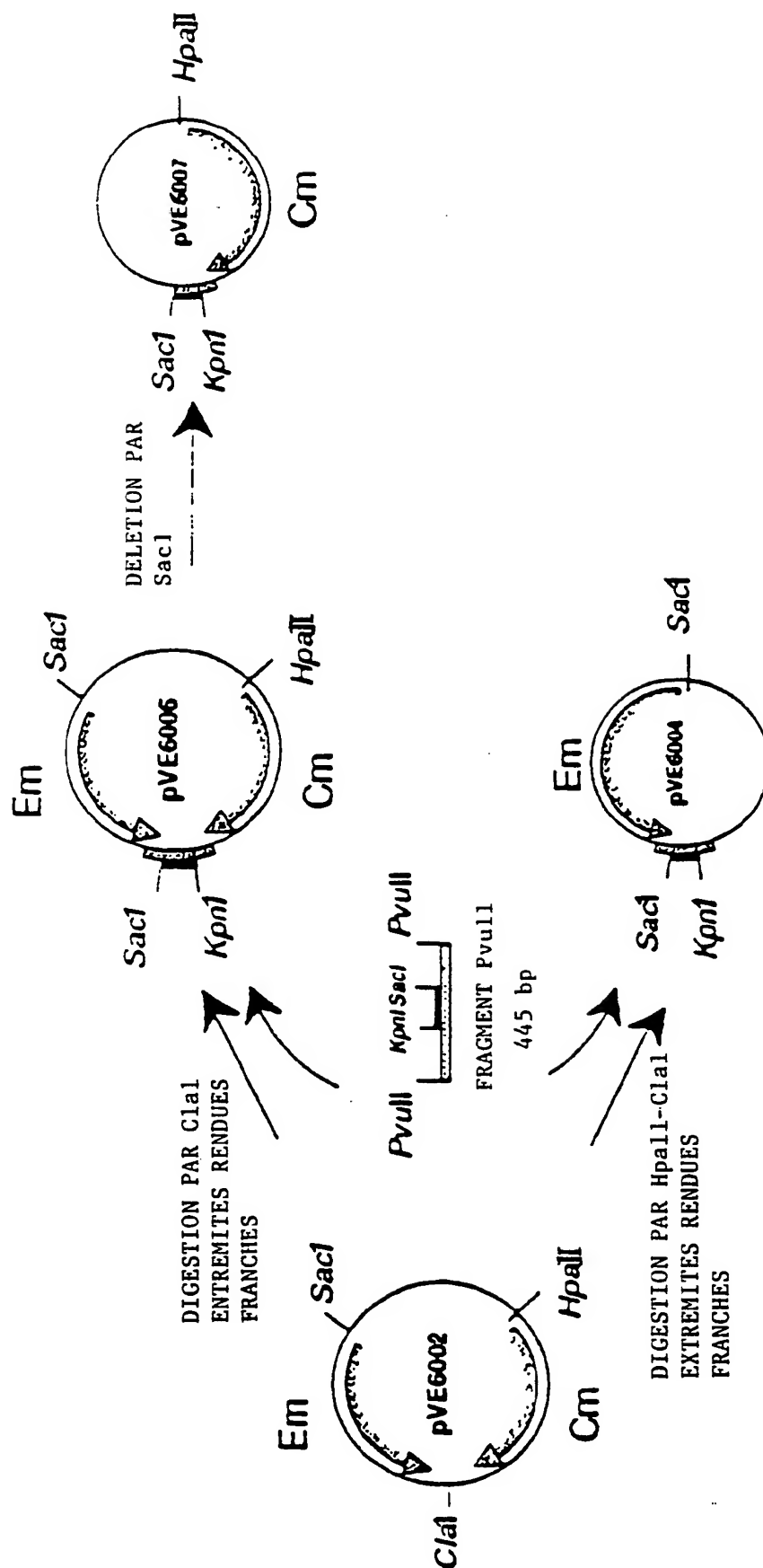


FIG.4

4/21

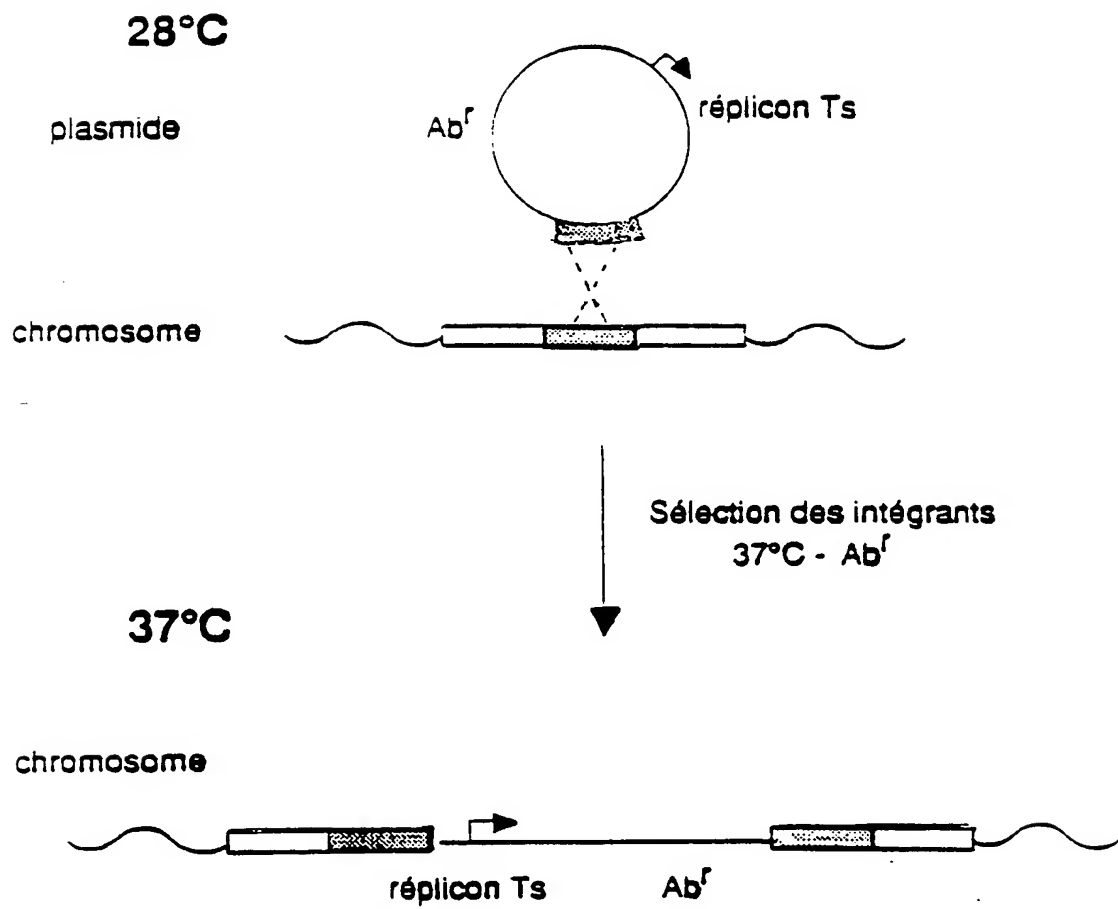
	50	60	70	80
PE.194	LHDRDTEGRM.....	KKEHYHILVMYEGNKSYEQI		
	*** *	** ** *	* ** *	** *
PLB.4	LHDKDVNPGEK.....	KKSHYHVLVNYKGNKSFEQI		
	**** *	** *		
PHPK.255	LHDKDLNEDGSH.....	KKPHFHAIIVFDKKQRPAAV		
	**** *	**** *		*
PADB.201	LHDKDVNPDGTI.....	KKPHYHIVLAYSCPTTFNNV		
	**** *	** ** *	* *	*
PLS.1	LHDKDKSSIKGQKY.....	KKAHYHVLVI AKNPVTADSV		
	*** *	** ** *	* ** *	** *
PWV.01	LHDMDEKLDKDTWNSSDVIRNGKH..	YKKPHYHVIYIARNPVTIESV		
	*****	*****	*****	*****
PHS.71	LHDMDEKKDKDTWNSSDVIRNGKH..	YKKPHYHVIYIARNPVTIESV		
	***** *	* ** ** *	*****	*****
PEX.2	LHDMDEKKIKIHGIVVMLYEMEMHIVIKNPHYHVYILHGNPVTIESV			
	50	60	70	80
consens	LIID D D	KKPHYH	P T E V	
	70	80	90	100

FIG.5

5/21

FIGURE 6

Intégration dans le chromosome du plasmide Ts



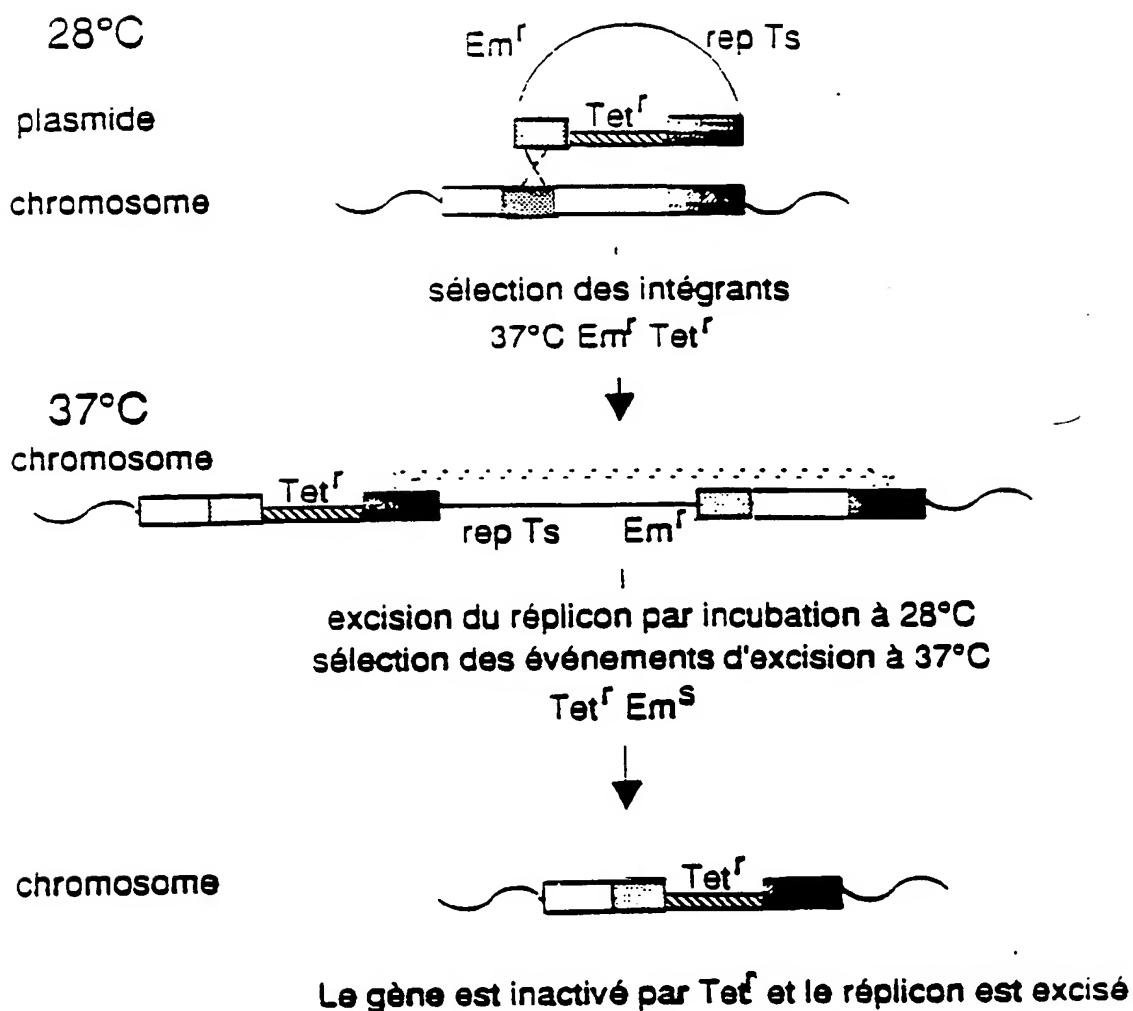
Le gène est inactivé par le plasmide intégré

FEUILLE DE REMPLACEMENT

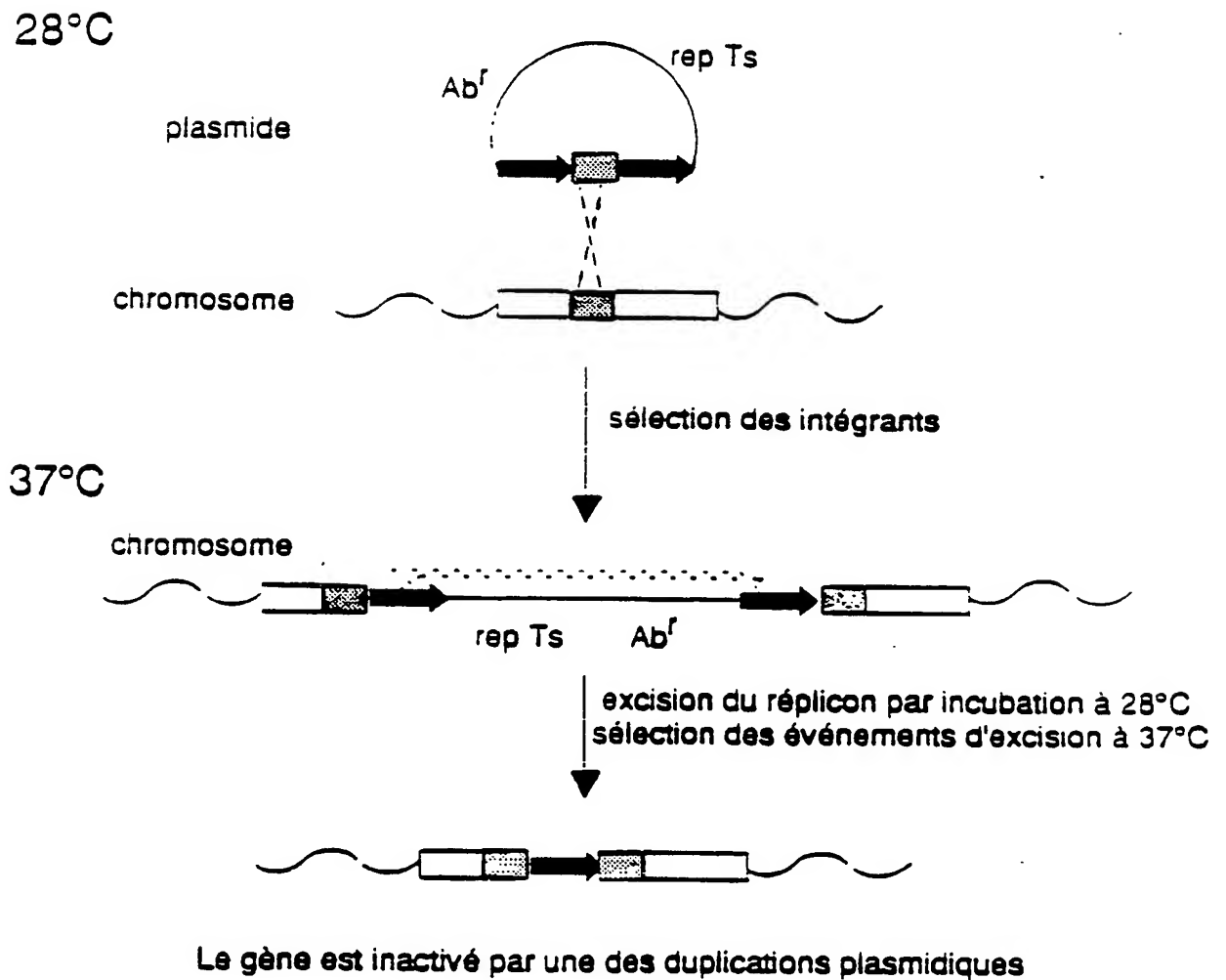
6/21

FIGURE 7A

EXEMPLE D'EXCISION DU REPLICON TS



7/21

FIGURE 7B**EXCISION DU REPLICON AU MOYEN
DE DUPLICATIONS PLASMIDIQUES**

8/21

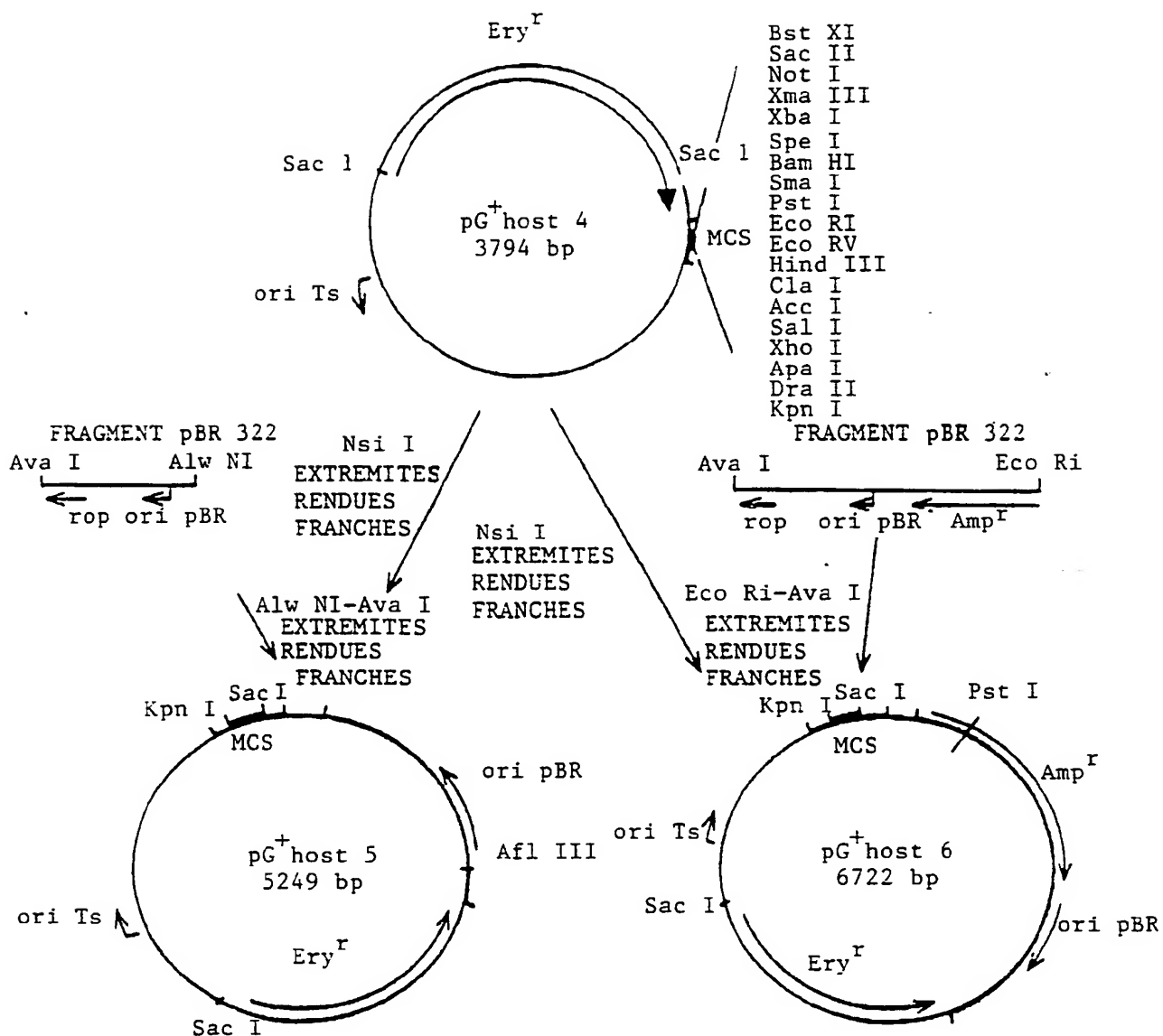


Fig. 8

9/21

pghost4.seq longueur : 3792

```
1  CGATTCACAA AAAATAGGCA CACGAAAAAC AAGTTAAGGG ATGCAGTTTA
51  TGCATCCCTT AACTTACTTA TTAAATAATT TATAGCTATT GAAAAGAGAT
101  AAGAATTGTT CAAAGCTAAT ATTGTTTAAA TCGTCAATTC CTGCATGTTT
151  TAAGGAATTG TTAAATTGAT TTTTGTAAA TATTTTCTTG TATTC1TTGT
201  TAACCCATTT CATACGAAA TAATTATACT TTTGTTTATC TTTGTGTGAT
251  ATTCTTGATT TTTTCTACT TAATCTGATA AGTGAGCTAT TCACTTTAGG
301  TTTAGGATGA AATATTTCTC TTGGAACCAT ACTTAATATA GAAATATCAA
351  CTTCTGCCAT TAAAGTAAT GCCAATGAGC GTTTTGTATT TAATAATCTT
401  TTAGCAAACC CTAATTCCAC GATTAAATAA ATCTCATTAG CTATACTATC
451  AAAAACCAAT TTGCGTATTA TATCCGTACT TATGTTATAA GGTATATTAC
501  CATATATTTT ATAGGATTGG TTTTATAGAA ATTTAAACTG CAATATATCC
551  TTGTTTAAAA CTTGGAAATT ATCGTGATCA ACAAGTTTAT TTTCTGTAGT
601  TTTGCATAAT TTATGGTCTA TTTCAATGGC AGTTACGAAA TTACACCTCT
651  TTACTAATTC AAGGGTAAAA TGGCCTTTTC CTGAGCCGAT TTCAAAGATA
701  TTATCATGTT CATTTAATCT TATA1TTGTC ATTATTTTAT CTATAT1TATG
751  TTTTGAAGTA ATAAAGTTTT GACTGTGTTT TATATTTTTC TCGTTCATTA
801  TAACCCTCTT TAATTGGTT ATATGAATTT TGCTTATTA CGATTCATTA
851  TAACCACTTA TTTTTTGTTT GGTGATAAT GAAGTGTGCT GATTACAAAA
901  AACTAAAAA TGCCCATATT TTTTCTCCT TATAAAATTA GTATAATTAT
951  AGCAGGAGCT CTGATAAATA TGAACATGAT GAGTGATCGT TAAATTTATA
1001  CTGCAATCGG ATGCGATTAT TGAATAAAAG ATATGAGAGA TTTATCTAAT
1051  TTCTTTTTTC TTGTAAAAAA AGAAAGTTCT TAAAGGTTT ATAGTTTGG
1101  TCGTAGAGCA CACGGTTTAA CGACTTAATT ACGAAGTAA TAAGTCTAGT
1151  GTGTTAGACT TTATGAAATC TATATACGT TATATATATT TATTATCGCA
1201  TTTTTTATTA AAACGTCTCA AAATCGTTTC TGAGACGTTT TAGCGTTTAT
1251  TTCGTTTAGT TATCGGCATA ATCGTTAAAA CAGGCGTTAT CGTAGCGTAA
1301  AAGCCCTTGA GCGTAGCGTG GCTTTGCAGC GAAGATGTTG TCTGTTAGAT
1351  TATGAAAGCC GATGACTGAA TGAATAATA AGCGCAGCGC CCTTCTATTT
```

FEUILLE DE REMPLACEMENT

10/21

1401 CGGTTGGAGG AGGCTCAAGG GAGTATGAGG GAATGAAATT CCTCATGGG
 1451 TTTGATTTTA AAAATTGCTT GCAATTTTGC CGAGCGGTAG CGCTGGAAAA
 1501 TTTTGGAAAA AAATTTGGAA TTTGGAAAAA AATGGGGGGA AAGGAAGCGA
 1551 ATTTTGCTTC CGTACTACGA CCCCCATTA AGTGCCGAGT GCCAATTTTT
 1601 GTGCCAAAAA CGCTCTATCC CAACTGGCTC AAGGGTTTAA GGGGTTTTTC
 1651 AATCGCCAAC GAATCGCCAA CGTTTTCGCC AACGTTTTTT ATAAATCTAT
 1701 ATTTAAGTAG CTTTATTGTT GTTTTTATGA TTACAAAGTG ATACACTAAC
 1751 TTTATAAAAT TATTTGATTG GAGTTTTTTA AATGGTGATT TCAGAATCGA
 1801 AAAAAAGAGT TATGATTTCT CTGACAAAAG AGCAAGATAA AAAATTAACA
 1851 GATATGGCGA AACAAAAAGG TTTTCAAAA TCTGCGGTTG CGGCGTTAGC
 1901 TATAGAAGAA TATGCAAGAA AGGAATCAGA ACAAAAAAAA TAAGCGAAAG
 1951 CTCGCGTTTT TAGAAGGATA CGAGTTTTTCG CTAATTGTTT TTGATAAGGT
 2001 AATTATATCA TGGCTATTAA AAATACTAAA GCTAGAAATT TTGGATTTTT
 2051 ATTATATCCT GACTCAATTC CTAATGATTG GAAAGAAAAA TTAGAGAGTT
 2101 TGGGCGTATC TATGGCTGTC AGTCCTTTAC ACGATATGGA CGAAAAAAA
 2151 GATAAAGATA CATGGAATAA TAGTAATATT ATACAAATG GAAAGCACTA
 2201 TAAAAACCA CACTATCACG TTATATATAT TGCACGAAT CCTGTAAACA
 2251 TAGAAAGCGT TAGGAACAG ATTAAAGCGA AATTGGGGAA TAGTTCAGTT
 2301 GCTCATGTTG AGATACTTGA TTATATCAAA GGTTTATATG ATATATTGAC
 2351 TCATGAATCA AAGGACGCTA TTGCTAAGAA TAAACATATA TACGACAAAA
 2401 AAGATATTTT GAACATTAAT GATTTTGATA TTGACCGCTA TATAACACTT
 2451 GATGAAAGCC AAAAAGAGA ATTGAAGAA TTACTTTTAG ATATAGTGGA
 2501 TGACTATAAT TTGGTAATA CAAAGATTT AATGGCTTTT ATTCGCCTTA
 2551 GGGGAGCGGA GTTTGGAAAT TTAAATACGA ATGATGTAAA AGATATTGTT
 2601 TCAACAACT CTAGCGCCTT TAGATTATGG TTTGAGGGCA ATTATCAGTG
 2651 TGGATATAGA GCAAGTTATG CAAAGGTTCT TGATGCTGAA ACGGGGGAAA
 2701 TAAATGACA AACAAAGAAA AAGAGTTATT TGCTGAAAT GAGGAATTAA
 2751 AAAAAGAAAT TAAGGACTTA AAAGAGCGTA TTGAAAGATA CAGAGAAATG
 2801 GAAGTTGAAT TAAGTACAAC AATAGATTTA TTGAGAGGAG GGATTATTGA

Fig. 9(suite)

FEUILLE DE REMPLACEMENT

11/21

2851 ATAAATAAAA GCCCCCTGAC GAAAGTCGAA GGGGGTTTTT ATTTTGGTTT
2901 GATGTTGCGA TTAATAGCAA TACAATTGCA ATAAACAAA TGATCTTCCT
2951 TCAGGTTATG ACCATCTGTG CCAGTTCGTA ATGTCTGGTC AACTTTCCGA
3001 CTCTGAGAAA CTTCTGGAAT CGCTAGAGAA TTTCTGGAAT GGGATTCAGG
3051 AGTGGACAGA ACGACACGGA TATATAGTGG ATGTGTCAAA ACGCATACCA
3101 TTTTGAACGA TGACCTCTAA TAATTGTTAA TCATGTTGGT TACGTATTTA
3151 TTAACCTCTC CTAGTATTAG TAATTATCAT GGCTGTCATG GCGCATTAAC
3201 GGAATAAAGG GTGTGCTTAA ATCGGGCCAT TTTGCGTAAT AAGAAAAAGG
3251 ATTAATTATG AGCGAATTGA ATTAATAATA AGGTAATAGA TTTACATTAG
3301 AAAATGAAAG GGGATTTTTAT GCGTGAGAAT GTTACAGTCT ATCCCTGGCG
3351 AAAGGGGGAT GTGCTGCAAG GCGATTAACT TGGGTAACGC CAGGGTTTTT
3401 CCAGTCACGA CGTTGTAAAA CGACGGCCAG TGAGCGCGCG TAATACGACT
3451 CACTATAGGG CGAATTGGGT ACCGGGCCCC CCCTCGAGGT CGACGGTATC
3501 GATAAGCTTG ATATCGAATT CCTGCAGCCC GGGGGATCCA CTAGTTCTAG
3551 AGCGGCCGCC ACCGCGGTGG AGCTCCAGCT TTTGTTCCCT TTAGTGAGGG
3601 TTAATTGCGC GCTTGCGTA ATCATGGTCA TAGCTGTTTC CTGTGTGAAA
3651 TTGTTATCCG CTCACAATTC CACACAACAT ACGAGCCGGA AGCATAAAGT
3701 GTAAAGCCTG GGGTGCCTAA TGAGTGAGCT AACTCACATT AATTGCGTTG
3751 CGCTCACTGC CCGCTTTCCA GTCGGGAAAC CTGTCGTGCC AG

Fig. 9 (suite)

12/21

pghost5.seq longueur : 5284
Length: 5234

```

1  AGGCACACGA AAAACAAGTT AAGGGATGCA GTTTA
                                     >seqed
   (inclus) de : pbr322.seq check: 5483 à partir de:1426 à
   2886>
                                     TCGGG CAGCGTTGGG

51  TCCTGGCCAC GGGTGCGCAT GATCGTGCTC CTGTCGTTGA GGACCCGGCT
101 AGGCTGGCGG GGTGCGCTTA CTGGTTAGCA GAATGAATCA CCGATACGCG
151 AGCGAACGTG AAGCGACTGC TGCTGCAAMA CGTCTGCGAC CTGAGCAACA
201 ACATGAATGG TCTTCGGTTT CCGTGTTTCG TAAAGTCTGG AAACGCGGAA
251 GTCAGCGCCC TGCACCATTA TGTTCGGGAT CTGCATCGCA GGATGCTGCT
301 GGCTACCCTG TGAACACCT ACATCTGTAT TAACGAAGCG CTGGCATTGA
351 CCCTGAGTGA TTTTCTCTG GTCCCGCCGC ATCCATACCG CCAGTTGTTT
401 ACCCTCACAA CGTTCCAGTA ACCGGGCATG TTCATCATCA GTAACCCGTA
451 TCGTGAGCAT CCTCTCTCGT TTCATCGGTA TCATTACCCC CATGAACAGA
501 AATCCCCCTT ACACGGAGGC ATCAGTGACC AAACAGGAAA AAACCGCCCT
551 TAACATGGCC CGCTTTATCA GAAGCCAGAC ATTAACGCTT CTGGAGAAAC
601 TCAACGAGCT GGACGCGGAT GAACAGGCAG ACATCTGTGA ATCGCTTCAC
651 GACCACGCTG ATGAGCTTTA CCGCAGCTGC CTCGCGCGTT TCGGTGATGA
701 CGGTGAAAAC CTCTGACACA TGCAGCTCCC GGAGACGGTC ACAGCTTGTC
751 TGTAAGCGGA TGCCGGGAGC AGACAAGCCC GTCAGGGCGC GTCAGCGGGT
801 GTTGGCGGGT GTCGGGGCGC AGCCATGACC CAGTCACGTA GCGATAGCGG
851 AGTGTATACT GGCTTAACTA TCGGCGATCA GAGCAGATTG TACTGAGAGT
901 GCACCATATG CGGTGTGAAA TACCGCACAG ATGCGTAAGG AGAAAATACC
951 GCATCAGGCG CTCTTCCGCT TCCTCGCTCA CTGACTCGCT GCGCTCGGTC
1001 GTTCGGCTGC GGCGAGCGGT ATCAGCTCAC TCAAAGGCGG TAATACGGTT
1051 ATCCACAGAA TCAGGGGATA ACGCAGGAAA GAACATGTGA GCAAAAGGCC
1101 AGCAAAAGGC CAGGAACCGT AAAAAGGCCG CGTTGCTGGC GTTTTTCCAT
1151 AGGCTCCGCC CCCCTGACGA GCATCACAAA AATCGACGCT CAAGTCAGAG
1201 GTGGCGAAAC CCGACAGGAC TATAAGATA CCAGGCGTTT CCCCCTGGAA

```

Fig. 10

FEUILLE DE REMPLACEMENT

13/21

1251 GCTCCCTCGT GCGCTCTCCT GTTCCGACCC TGCCGCTTAC CGGATACCTG
 1301 TCCGCCTTTC TCCCTTCGGG AAGCGTGGCG CTTTCTCATA GCTCAGCGTG
 1351 TAGGTATCTC AGTTCGGTGT AGGTCGTTCG CTCCAAGCTG GGCTGTGTGC
 1401 ACGAACCCCC CGTTCAGCCC GACCGCTGCG CCTTATCCGG TAACTATCGT
 1451 CTTGAGTCCA ACCCGGTAAG ACACGACTTA TCGCCACTGG CAGCAG

ed (inclus) de : pbr322.seq check: 5483 à partir de: 1426
 à : 2886<

TCCC

1501 TTAACCTACT TATTAAATAA TTTATAGCTA TTGAAAAGAG ATAAGAATTG
 1551 TTCAAAGCTA ATATTGTTTA AATCGTCAAT TCCTGCATGT TTTAAGGAAT
 1601 TGTTAAATTG ATTTTTTGTA AATATTTTCT TGTATTCTTT GTTAACCCAT
 1651 TTCATAACGA AATAATTATA CTTTGTTTA TCTTTGTGTG ATATTCTTGA
 1701 TTTTTTTCTA CTTAATCTGA TAAGTGAGCT ATTCACTTTA GGTTTAGGAT
 1751 GAAAATATTC TCTTGGAACC ATACTTAATA TAGAATATC AACTTCTGCC
 1801 ATTAAAAGTA ATGCCAATGA GCGTTTTGTA TTTAATAATC TTTTAGCAAA
 1851 CCCGTATTCC ACGATTAAAT AAATCTCAAT AGCTATACTA TCAAAAACAA
 1901 TTTTGCGTAT TATATCCGTA CTTATGTTAT AAGGTATATT ACCATATATT
 1951 TTATAGGATT GGTTTTTAGG AAATTTAATC TGCAATATAT CCTTGTTTAA
 2001 AACTTGGAAT TTATCGTGAT CAACAAGTTT ATTTTCTGTA GTTTTGCATA
 2051 ATTTATGGTC TATTTCAATG GCAGTTACGA AATTACACCT CTTTACTAAT
 2101 TCAAGGGTAA AATGGCCTTT TCCTGAGCCG ATTTCAAAGA TATTATCATG
 2151 TTCATTTAAT CTTATATTG TCATTATTTT ATCTATATTA TGTTTTGAAG
 2201 TAATAAAGTT TTGACTGTGT TTTATATTTT TCTCGTTCAT TATAACCCTC
 2251 TTTAATTTGG TTATATGAAT TTTGCTTATT AACGATTCAT TATAACCACT
 2301 TATTTTTTGT TTGGTTGATA ATGAACTGTG CTGATTACAA AAATACTAAA
 2351 AATGCCCATTA TTTTTCCTC CTTATAAAAT TAGTATAATT ATAGCACGAG
 2401 CTCTGATAAA TATGAACATG ATGAGTGATC GTTAAATTTA TACTGCAATC
 2451 GGATGCGATT ATTGAATAAA AGATATGAGA GATTATCTA ATTTCTTTTT
 2501 TCTTGTAATAA AAAGAAAGTT CTTAAAGGTT TTATAGTTTT GGTCGTAGAG
 2551 CACACGGTTT AACGACTTAA TTACGAAGTA AATAAGTCTA GTGTGTTAGA

Fig. 10 (suite)

FEUILLE DE REMPLACEMENT

14/21

2601 CTTTATGAAA TCTATATACG TTTATATATA TTTATTATC
 (inclus) de : pwv01. check:7166 à partir de : 1 à: 1744>
 >SEQED
 C GATTTTTTAT

2651 TAAAACGTCT CAAAATCGTT TCTGAGACGT TTTAGCGTTT ATTTTCGTTTA

2701 GTTATCGGCA TAATCGTTAA AACAGGCGTT ATCGTAGCGT AAAAGCCCTT

2751 GAGCGTAGCG TGGCTTTGCA GCGAAGATGT TGTCTGTAG ATTATGAAAG

2801 CCGATGACTG AATGAAATAA TAAGCGCAGC GCCCTTCTAT TTCGGTTGGA

2851 GGAGGCTCAA GGGAGTATGA GGGAAATGAAA TTCCCTCATG GGTTCGATTT

2901 TAAAAATTGC TTGCAATTTT GCCGAGCGGT AGCGCTGGAA AATTTTTGAA

2951 AAAAAATTGG AATTTGGAAA AAAATGGGGG GAAAGGAAGC GAATTTTGCT

3001 TCCGTACTAC GACCCCCCAT TAAGTGCCGA GTGCCAATTT TTGTGCCAAA

3051 AACGCTCTAT CCCAACTGGC TCAAGGGTTT AAGGGGTTTT TCAATCGCCA

3101 ACGAATCGCC AACGTTTTTCG CCAACGTTTT TTATAAATCT ATATTTAAGT

3151 AGCTTTATTG TTGTTTTTAT GATTACAAAG TGATACACTA ACTTTATAAA

3201 ATTATTTGAT TGGAGTTTTT TAAATGGTGA TTTCAGAATC GAAAAAAGA

3251 GTTATGATTT CTCTGACAAA AGAGCAAGAT AAAAAATTAA CAGATATGGC

3301 GAAACAAAAA GGTTTTTTCAA AATCTGCGGT TGCGGCGTTA GCTATAGAAG

3351 AATATGCAAG AAAGGAATCA GAACAAAAA AATAAGCGAA AGCTCGCGTT

3401 TTTAGAAGGA TACGAGTTTT CGCTACTTGT TTTTGATAAG GTATTATAT

3451 CATGGCTATT AAAAATACTA AAGCTAGAAA TTTTGGATTT TTATTATATC

3501 CTGACTCAAT TCCTAATGAT TGGAAAGAAA AATTAGAGAG TTTGGGCGTA

3551 TCTATGGCTG TCAGTCCTTT ACACGATATG GACGAAAAA AAGATAAAGA

3601 TACATGGAAT AATAGTAATA TTATACAAA TGGAAAGCAC TATAAAAAAC

3651 CACACTATCA CGTTATATAT ATTGCACGAA ATCCTGTAAC AATAGAAAGC

3701 GTTAGGAACA AGATTAAGCG AAAATTGGGG AATAGTTCAG TTGCTCATGT

3751 TGAGATACTT GATTATATCA AAGGTTTATA TGAATATTTG ACTCATGAAT

3801 CAAAGGACGC TATTGCTAAG AATAAACATA TATACGACAA AAAAGATATT

3851 TTGAACATTA ATGATTTTGA TATTGACCGC TATATAACAC TTGATGAAAG

3901 CAAAAAAGA GAATTGAAGA ATTTACTTTT AGATATAGTG GATGACTATA

3951 ATTTGGTAA TACAAAAGAT TTAATGGCTT TTATTGCGCT TAGGGGAGCG

Fig. 10 (suite)

FEUILLE DE REMPLACEMENT

15/21

4001 GAGTTTGGAA TTTTAANTAC GAATGATGTA AAAGATATTG TTTCAACAAA
 4051 CTCTAGCGCC TTTAGATTAT GGTTTGAGGG CAATTATCAG TGTGGATATA
 4101 GAGCAAGTTA TGCAAAGGTT CTTGATGCTG AAACGGGGGA AATAAAATGA
 4151 CAAACAAAGA AAAAGAGTTA TTTGCTGAAA ATGAGGAATT AAAAAAGAA
 4201 ATTAAGGACT TAAAAGAGCG TATTGAAAGA TACAGAGAAA TGGAAAGTTGA
 4251 ATTAAGTACA ACAATAGATT TATTGAGAGG AGGGATTATT GAATAAATAA
 4301 AAGCCCCCTG ACGAAAGTCG AAGGGGGTTT TTATTTTGGT TTGATGTTGC
 4351 GATTAATAGC AATACAAATTG CAATAAACAA AAT
 <SEQED (inclus)
 de: pwv01. check: 7166 à partir de : 1 à: 1744<
 >SEQED (inclus)
 reverse de: pub110.seq check: 5091 à partir de : 1964 à:
 2366>
 GATCTTC CTTGAGTTA
 4401 TGACCATCTG TGCCAGTTCTG TAATGTCTGG TCAACTTTCC GACTCTGAGA
 4451 AACTTCTGGA ATCGCTAGAG AATTTCTGGA ATGGGATTCA GGAGTGGACA
 4501 GAACGACACG GATATATAGT GGATGTGTCA AAACGCATAC CATTTTGAAC
 4551 GATGACCTCT AATAATTGTT AATCATGTTG GTTACGTATT TATTAAC TTC
 4601 TCCTAGTATT AGTAATTATC ATGGCTGTCA TGGCGCATT ACGGAATAAA
 4651 GGGTGTGCTT AAATCGGGCC ATTTTGCGTA ATAAGAAAAA GGATTAATTA
 4701 TGAGCGAATT GAATTAATTA TAAGGTAATA GATTTACATT AGAAAATGAA
 4751 AGGGGATTTT ATGCGTGAGA ATGTTACAGT CTATCC
 <SEQED
 (inclus) reverse de: pub110.seq check: 5091 à partir de:
 1964 à: 2366<
 >seqed
 (inclus) de: psk.seq check: 8495 à partir de: 530 à: 977>
 CTGG CGAAAGGGGG
 4801 ATGTGCTGCA AGGCGATTAA GTTGGGTAAC GCCAGGGTTT TCCCAGTCAC
 4851 GACGTTGTAA AACGACGGCC AGTGACGCG CGTAATACGA CTCACTATAG
 4901 GGCGAATTGG GTACCGGGCC CCCCCTCGAG GTCGACGGTA TCGATAAGCT
 4951 TGATATCGAA TTCCTGCAGC CCGGGGGATC CACTAGTTCT AGAGCGGCCG
 5001 CCACCGCGGT GGAGCTCCAG CTTTTGTTCC CTTTAGTGAG GGTAAATTGC
 5051 GCGCTTGGCG TAATCATGGT CATAGCTGTT TCCTGTGTGA AATTGTTATC
 5101 CGCTCACAAT TCCACACAAC ATACGAGCCG GAAGCATAAA GTGTAAAGCC

Fig. 10 (suite)

FEUILLE DE REMPLACEMENT

16/21

5151 TGGGGTGCCT AATGAGTGAG CTAATCACA TTAATTGCGT TGCCTCACT
5201 .GCCCCGCTTTC CAGTCGGGAA ACCTGTCGTG CCAG

de: psk.seq check: 8495 à partir de: 530 à: 977< <seqed (inclus)
de: pc1.ba check: 2015 à partir de: 974 à: 2004> >SEQED (inclus)

Fig. 10 (suite)

17/21

pghost6.seq longueur 6722 Type: N

```
1  CGATTACAA AAAATAGGCA CACGAAAAAC AAGTTAAGGG ATGCAGTTTA
51  AATTC'TGAA GACGAAAGGG CCTCGTGATA CGCCTATTTT TATAGGT'AA
101 TGTCATGATA ATAATGGTTT CTTAGACGTC AGGTGGCACT TTTCGGGGAA
151 ATGTGCGCGG AACCCCTATT TG'TTTATTTT TCTAAATACA TTCAAATATG
201 TATCCGCTCA TGAGACAATA ACCCTGATAA ATGCTTCAAT AATATTGAAA
251 AAGGAAGAGT ATGAGTATTC AACATTTCCG TGTCGCCCTT ATCCCTTTT'
301 TTGCGGCATT TTGCCTTCCT GTTTT'GCTC ACCCAGAAAC GCTGGTGAAA
351 GTAAAAGATG CTGAAGATCA GTTGGGTGCA CGAGTGGGTT ACATCGAACT
401 GGATCTCAAC AGCGGTAAGA TCCTTGAGAG TTTTCGCCCC GAAGAACGTT
451 TTCCAATGAT GAGCACTTTT AAAGTTCTGC TATGTGGCGC GGTATTATCC
501 CGTGTGACG CCGGGCAAGA GCAACTCGGT CGCCGCATAC ACTATTCTCA
551 GAATGACTTG GTTGAGTACT CACCAGTCAC AGAAAAGCAT CTTACGGATG
601 GCATGACAGT AAGAGAATTA TGCAGTGCTG CCATAACCAT GAGTGATAAC
651 ACTGCGGCCA ACTTACTTCT GACAACGATC GGAGGACCGA AGGAGCTAAC
701 CGCTTTTTTG CACAACATGG GGGATCATGT AACTCGCCTT GATCGTTGGG
751 AACCGGAGCT GAATGAAGCC ATACCAAACG ACGAGCGTGA CACCACGATG
801 CCTGCAGCA TGGCAACAAC GTTGCGCAA CTATTA'ACTG GCGAACTACT
851 TACTCTAGCT TCCCGGCAAC AATTAATAGA CTGGATGGAG GCGGATAAAG
901 TTGCAGGACC ACTTCTGCGC TCGGCCCTTC CGGCTGGCTG GTTTATTGCT
951 GATAAATCTG GAGCCGGTGA GCGTGGGTCT CGCGGTATCA TTGCAGCACT
1001 GGGGCCAGAT GGTAAGCCCT CCCGTATCGT AGTTATCTAC ACGACGGGGA
1051 GTCAGGCAAC TATGGATGAA CGAAATAGAC AGATCGCTGA GATAGGTGCC
1101 TCACTGATTA AGCATTGGTA ACTGTCAGAC CAAGTTTACT CATATATACT
1151 TTAGATTGAT TTAA'ACTTC ATTTT'AAAT TAAAAGGATC TAGGTGAAGA
1201 TCCTTTT'TGA TAATCTCATG ACCAAAATCC CTTA'ACGTGA GTTTTCGTTT
1251 CACTGAGCGT CAGACCCCGT AGAAAAGATC AAAGGATCTT CTTGAGATCC
1301 TTTTTTCTG CGCGTAATCT GCTGCTTGCA AACAAAAAAA CCACCGCTAC
1351 CAGCGGTGGT TTGTTTGCCG GATCAAGAGC TACCAACTCT TTTTCCGAAG
```

FIG. 11

FEUILLE DE REMPLACEMENT

18/21

2402 GTAAGTGGCT TCAGCAGAGC GCAGATACCA AATACTGTCC TTCTAGTGTA
1451 GCCGTAGTTA GGCCACCACT TCAAGAACTC TGTAGCACCG CCTACATACC
1501 TCGCTCTGCT AATCCTGTTA CCAGTGGCTG CTGCCAGTGG CGATAAGTCG
1551 TGTCTTACCG GGTGGACTC AAGACGATAG TTACCGGATA AGGCGCAGCG
1601 GTCGGGCTGA ACGGGGGGTT CGTGCACACA GCCCAGCTTG GAGCGAACA
1651 CCTACACCGA ACTGAGATAC CTACAGCGTG AGCTATGAGA AAGCGCCACG
1701 CTTCCCGAAG GGAGAAAGGC GGACAGGTAT CCGGTAAGCG GCAGGGTCCG
1751 AACAGGAGAG CGCACGAGGG AGCTTCCAGG GGGAAACGCC TGGTATCTTT
1801 ATAGTCCTGT CGGGTTTCGC CACCTCTGAC TTGAGCGTCG ATTTTGTGA
1851 TGCTCGTCAG GGGGGCGGAG CCTATGGAA AACGCCAGCA ACGCGGCCTT
1901 TTTACGGTTC CTGGCCTTTT GCTGGCCTTT TGCTCACATG TTCTTCTCTG
1951 CGTTATCCCC TGATTCTGTG GATAACCGTA TTACCGCCTT TGAGTGAGCT
2001 GATACCGCTC GCCGCAGCCG AACGACCGAG CGCAGCGAGT CAGTGAGCGA
2051 GGAAGCGGAA GAGCGCCTGA TCGGGTATTT TCTCCTTACG CATCTGTGCG
2101 GTATTTTACA CCGCATATGG TGCACCTCA GTACAATCTG CTCTGATGCC
2151 GCATAGTTAA GCCAGTATAC ACTCCGCTAT CGCTACGTGA CTGGGTCATG
2201 GCTGCGCCCC GACACCCGCC AACACCCGCT GACGCGCCCT GACGGGCTTG
2251 TCTGCTCCCG GCATCCGCTT ACAGACAGC TGTGACCGTC TCCGGGAGCT
2301 GCATGTGTCA GAGGTTTTCA CCGTCATCAC CGAAACGCGC GAGGCAGCTG
2351 CGGTAAAGCT CATCAGCGTG GTCGTGAAGC GATTCACAGA TGTCTGCCTG
2401 TTCATCCGCG TCCAGCTCGT TGAGTTTCTC CAGAAGCGTT AATGTCTGGC
2451 TTCTGATAAA GCGGGCCATG TTAAGGGCGG TTTTTCCTG TTTGGTCACT
2501 GATGCCTCCG TGTAAAGGGG ATTTCTGTTC ATGGGGGTAA TGATACCGAT
2551 GAAACGAGAG AGGATGCTCA CGATACGGGT TACTGATGAT GAACATGCCC
2601 GGTTACTGGA ACGTTGTGAG GGTAAACAAC TGGCGGTATG GATGCGGCGG
2651 GACCAGAGAA AAATCACTCA GGGTCAATGC CAGCGCTTCG TTAATACAGA
2701 TGTAGGTGTT CCACAGGGTA GCCAGCAGCA TCCTGCGATG CAGATCCGGA
2751 ACATAATGGT GCAGGGCGCT GACTTCCGCG TTTCCAGACT TTACGAAACA
2801 CGGAAACCGA AGACCATTC A GTTGTGCT CAGGTGCGAG ACGTTTTGCA

Fig. 11 (suite)

FEUILLE DE REMPLACEMENT

19/21

2851 GCAGCAGTCG CTTACGTTT GCTCGCGTAT CGGTGATTCA TTCTGCTAAC
2901 CAGTAAGGCA ACCCCGCCAG CCTAGCCGGG TCCTCAACGA CAGGAGCACC
2951 ATCATGCGCA CCCGTGGCCA GGACCCAACG CTGCTCCCTT AACTTACTTA
3001 TTAAATAATT TATAGCTATT GAAAAGAGAT AAGAATTGTT CAAAGCTAAT
3051 ATTGTTTAAA TCGTCAATTC CTGCATGTTT TAAGGAATTG TTAAATTGAT
3101 TTTTGTAAA TATTTTCTTG TATTCCTTGT TAACCCATTT CATACGAAA
3151 TAATTATACT TTTGTTTATC TTTGTGTGAT ATTCTTGATT TTTTCTACT
3201 TAATCTGATA AGTGAGCTAT TCACTTTAGG TTTAGGATGA AAATATTCTC
3251 TTGGAACCAT ACTTAATATA GAAATATCAA CTTCTGCCAT TAAAAGTAAT
3301 GCCAATGAGC GTTTTGTATT TAATAATCTT TTAGCAAACC CGTATTCCAC
3351 GATTAAATAA ATCTCATTAG CTATACTATC AAAACAATT TTGCGTATTA
3401 TATCCGTACT TATGTTATAA GGTATATTAC CATATATTTT ATAGGATTGG
3451 TTTTTAGGAA ATTTAAACTG CATATATCC TTGTTTAAAA CTTGGAAATT
3501 ATCGTGATCA ACAAGTTTAT TTTCTGTAGT TTTGCATAAT TTATGGTCTA
3551 TTTCAATGGC AGTTACGAAA TTACACCTCT TACTAATTC AAGGGTAAAA
3601 TGGCCTTTTC CTGAGCCGAT TTCAAAGATA TTATCATGTT CATTTAATCT
3651 TATATTTGTC ATTATTTTAT CTATATTATG TTTTGAAGTA ATAAAGTTTT
3701 GACTGTGTTT TATATTTTTC TCGTTCATTA TAACCCTCTT TAATTTGGTT
3751 ATATGAATTT TGCTTATTAA CGATTCAATTA TAACCACCTA TTTTGTGTTT
3801 GGTGATAAT GAACTGTGCT GATTACAAAA ATACTAAAAA TGCCCATATT
3851 TTTTCCTCCT TATAAAATTA GTATAATTAT AGCACGAGCT CTGATAAATA
3901 TGAACATGAT GAGTGATCGT TAAATTTATA CTGCAATCGG ATGCGATTAT
3951 TGAATAAAAG ATATGAGAGA TTTATCTAAT TTCTTTTTTC TTGTAAAAA
4001 AGAAAGTTCT TAAAGGTTTT ATAGTTTTGG TCGTAGAGCA CACGGTTTTA
4051 CGACTTAATT ACGAAGTAAA TAAGTCTAGT GTGTTAGACT TTATGAAATC
4101 TATATACGTT TATATATATT TATTATCCGA TTTTTTATTA AAACGTCTCA
4151 AATTCGTTTC TGAGACGTTT TAGCGTTTAT TTCGTTTAGT TATCGGCATA
4201 ATCGTTAAAA CAGGCGTTAT CGTAGCGTAA AAGCCCTTGA GCGTAGCGTG
4251 GCTTTGCAGC GAAGATGTTG TCTGTTAGAT TATGAAAGCC GATGACTGAA

Fig. 11 (suite)

FEUILLE DE REMPLACEMENT

20/21

4301 TGAATAATA AGCGCAGCGC CCTTCTATTT CGGTGGAGG AGGCTCAAGG
4351 GAGTATGAGG GAATGAAATT CCCTCATGGG TTTGATTTTA AAAATTGCTT
4401 GCAATTTTGC CGAGCGGTAG CGCTGGAAAA TTTTGGAAAA AAATTTGGAA
4451 TTTGGAAAAA AATGGGGGGA AAGGAAGCGA ATTTTGCTTC CGTACTACGA
4501 CCCCCATTA AGTGCCGAGT GCCAATTTTT GTGCCAAAAA CGCTCTATCC
4551 CAACTGGCTC AAGGGTTTAA GGGGTTTTTC AATCGCCAAC GAATCGCCAA
4601 CGTTTTCGCC AACGTTTTTT ATAAATCTAT ATTTAAGTAG CTTTATTGTT
4651 GTTTTTATGA TTACAAAGTG ATACACTAAC TTTATAAAAA TATTTGATTG
4701 GAGTTTTTTA AATGGTGATT TCAGAATCGA AAAAAAGAGT TATGATTCT
4751 CTGACAAAG AGCAAGATAA AAATTAACA GATATGGCGA AACAAAAAGG
4801 TTTTTCAAA TCTGCGGTTG CGGCGTTAGC TATAGAAGA TATGCAAGAA
4851 AGGAATCAGA ACAAAAAAAA TAGCGAAAG CTCGCGTTTT TAGAAGGATA
4901 CGAGTTTTCG CTACTTGTTT TTGATAAGGT AATTATATCA TGGCTATTAA
4951 AAATACTAAA GCTAGAAATT TTGGATTTTT ATTATATCCT GACTCAATTC
5001 CTAATGATTG GAAAGAAAAA TTAGAGAGTT TGGGCGTATC TATGGCTGTC
5051 AGTCCTTTAC ACGATATGGA CGAAAAAAA GATMAAGATA CATGGAATAA
5101 TAGTAATATT ATACAAAATG GAAAGCACTA TAAAAACCA CACTATCACG
5151 TTATATATAT TGCACGAAAT CCTGTAAACA TAGAAAGCGT TAGGAACAAG
5201 ATTAAGCGAA AATTGGGGAA TAGTTCAGTT GCTCATGTTG AGATACTTGA
5251 TTATATCAAA GGTTCATATG ATATTTGAC TCATGAATCA AAGGACGCTA
5301 TTGCTAAGAA TAAACATATA TACGACAAA AAGATATTTT GAACATTAAT
5351 GATTTTGATA TTGACCGCTA TATAACACTT GATGAAAGCC AAAAAAGAGA
5401 ATTGAAGAAT TTACTTTTAG ATATAGTGA TGA CTATAAT TTGGTAAATA
5451 CAAAAGATTT AATGGCTTTT ATTCGCCTTA GGGGAGCGGA GTTTGGAATT
5501 TTAAATACGA ATGATGTAAA AGATATTGTT TCAACAACT CTAGCGCCTT
5551 TAGATTATGG TTTGAGGGCA ATTATCAGTG TGGATATAGA GCAAGTTATG
5601 CAAAGGTTCT TGATGCTGAA ACGGGGGAAA TAAATGACA AACAAAGAAA
5651 AAGAGTTATT TGCTGAAAT GAGGAATTA AAAAAAGAAAT TAAGGACTTA
5701 AAAGAGCGTA TTGAAAGATA CAGAGAAATG GAAGTTGAAT TAAGTACAAC

Fig. 11 (suite)

FEUILLE DE REMPLACEMENT

21/21

5751 AATAGATTTA TTGAGAGGAG GGATTATTGA ATAAATAAAA GCCCCCTGAC
5801 GAAAGTCGAA GGGGGTTTTT ATTTTGGTTT GATGTTGCGA TTAATAGCAA
5851 TACAAATTGCA ATAAACAAAA TGATCTTCCT TCAGGTTATG ACCATCTGTG
5901 CCAGTTCGTA ATGTCTGGTC AACTTTCCGA CTCTGAGAAA CTTCTGGAAT
5951 CGCTAGAGAA TTTCTGGAAT GGGATTCAGG AGTGGACAGA ACGACACGGA
6001 TATATAGTGG ATGTGTCAAA ACGCATACCA TTTTGAACGA TGACCTCTAA
6051 TAATTGTAA TCATGTTGGT TACGTATTTA TTAACCTCTC CTAGTATTAG
6101 TAATTATCAT GGCTGTCATG GCGCATTAAC GGAATAAAGG GTGTGCTTAA
6151 ATCGGGCCAT TTTGCGTAAT AAGAAAAGG ATTAATTATG AGCGAATTGA
6201 ATTAATAATA AGGTAATAGA TTTACATTAG AAAATGAAAG GGGATTTTAT
6251 GCGTGAGAAT GTTACAGTCT ATCCCTGGCG AAAGGGGGAT GTGCTGCAAG
6301 GCGATTAAGT TGGGTAACGC CAGGGTTTTT CCAGTCACGA CGTTGTAAAA
6351 CGACGGCCAG TGAGCGCGCG TAATACGACT CACTATAGGG CGAATTGGGT
6401 ACCGGGCCCC CCCTCGAGGT CGACGGTATC GATAAGCTTG ATATCGAATT
6451 CCTGCAGCCC GGGGGATCCA CTAGTTCTAG AGCGGCCGCC ACCGCGGTGG
6501 AGCTCCAGCT TTTGTTCCTT TTAGTGAGGG TTAATTGCGC GCTTGGCGTA
6551 ATCATGGTCA TAGCTGTTTC CTGTGTGAAA TTGTTATCCG CTCACAATTC
6601 CACACAACAT ACGAGCCGGA AGCATAAAGT GTAAAGCCTG GGGTGCCTAA
6651 TGAGTGAGCT AACTCACATT AATTGCGTTG CGCTCACTGC CCGCTTTCCA
6701 GTCGGGAAAC CTGTCGTGCC AG

Fig. 11 (suite)

International application No.

PCT/FR 93/00248

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.5: C12N15/74; C21N1/21

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl. 5: C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY Vol. 57, No. 2, 1991, WASHINGTON DC pages 539 - 548 FEIRTAG J M ; PETZEL J P ; PASALODOS E; BALDWIN K A; MCKAY L L 'THERMOSENSITIVE PLASMID REPLICATION TEMPERATURE-SENSITIVE HOST GROWTH AND CHROMOSOMAL PLASMID INTEGRATION CONFERRED BY LACTOCOCCUS-LACTIS- -SSP-CREMORIS LACTOSE PLASMIDS IN LACTOCOCCUS-LACTIS- -SSP-LACTIS' see the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	<p>1-4, 19-24</p>
Y	<p>EP,A,0 445 385 (DEGUSSA AKTIENGESELLSCHAFT) 11 September 1991</p>	1,19,20,22
A	<p>see the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	2-7,15,16,21
Y	<p>EP,A,0 243 856 (HOECHST A.G.) 4 November 1987</p>	1,19,20,22
A	<p>see the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	2-7,15,16,21, 23,24
	-/-	

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 Máj 1993 (28.05.93)

Date of mailing of the international search report

28 June 1993 (28.06.93)

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office
Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No. _____

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 93/00248

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP,A,0 182 562 (SOLVAY & CIE.) 28 May 1986 see the whole document	1,19-24
A	JOURNAL OF BACTERIOLOGY Vol.172, No.8, 1990, BALTIMORE US pages 4543 - 4548 SOZHAMANNAN S; DABERT P; MORETTO V; EHRLICH S D; GRUSS A ' PLUS-ORIGIN MAPPING OF SINGLE-STRANDED DNA PLASMID P-E-194 AND NICK SITE HOMOLOGIES WITH OTHER PLASMIDS' cited in the application see the whole document	1,2,19-24
A	BIOLOGICAL ABSTRACTS Vol. 87 Philadelphia, PA, US; abstract No. 047423, ALONSO J C; STIEGE C A; TAILOR R H; VIRET J-F 'FUNCTIONAL ANALYSIS OF THE DNA-TS MUTANTS OF BACILLUS-SUBTILIS PLASMID PUBL10 REPLICATION AS A MODEL SYSTEM' see abstract & MOL GEN GENET 214 (3). 1988. 482-489.	1,9-11
A	BIOLOGICAL ABSTRACTS Vol. 92 Philadelphia, PA, US; abstract No. 075453, LEENHOUTS K J; KOK J; VENEMA G 'REPLACEMENT RECOMBINATION IN LACTOCOCCUS-LACTIS' see abstract & J. BACTERIOL 173 (15). 1991. 4794-4798.	5,8
A	BIOLOGICAL ABSTRACTS Vol. 88 Philadelphia, PA, US; abstract No. 107483, PRIEBE S D; LACKS S A 'REGION OF THE STREPTOCOCCAL PLASMID PMV158 REQUIRED FOR CONJUGATIVE MOBILIZATION' see abstract & J. BACTERIOL 171 (9). 1989. 4778-4784.	15
P,X	JOURNAL OF BACTERIOLOGY Vol. 174, No. 17, 1992, BALTIMORE US pages 5633 - 5638 MAGUIN E; DUWAT P; HEGE T; EHRLICH D; GRUSS A 'NEW THERMOSENSITIVE PLASMID FOR A GRAM-POSITIVE BACTERIA' see the whole document	1-24

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

FR 9300248
SA 71737

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

28/05/93

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0445385	11-09-91	DE-A- 4006637	05-09-91
EP-A-0243856	04-11-87	DE-A- 3614310	29-10-87
		JP-A- 62259592	11-11-87
EP-A-0182562	28-05-86	GB-A- 2166743	14-05-86
		DE-A- 3584351	14-11-91
		JP-A- 61173783	05-08-86

EPO FORM P0079

For more details about this annex : see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ⁷		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB CIB 5 C12N15/74; C12N1/21		
II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE		
Documentation minimale consultée ⁸		
Système de classification	Symboles de classification	
CIB 5	C12N	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté ⁹		
III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS ¹⁰		
Catégorie ^o	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, ¹² des passages pertinents ¹³	No. des revendications visées ¹⁴
X	APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY vol. 57, no. 2, 1991, WASHINGTON D C pages 539 - 548 FEIRTAG J M; PETZEL J P; PASALODOS E; BALDWIN K A; MCKAY L L 'THERMOSENSITIVE PLASMID REPLICATION TEMPERATURE-SENSITIVE HOST GROWTH AND CHROMOSOMAL PLASMID INTEGRATION CONFERRED BY LACTOCOCCUS-LACTIS-SSP-CREMORIS LACTOSE PLASMIDS IN LACTOCOCCUS-LACTIS-SSP-LACTIS' voir le document en entier ---	1-4, 19-24
Y	EP, A, 0 445 385 (DEGUSSA AKTIENGESELLSCHAFT) 11 Septembre 1991 voir le document en entier ---	1, 19, 20, 22
A	---	2-7, 15, 16, 21 -/-
^o Catégories spéciales de documents cités: ¹¹ "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier. "A" document qui fait partie de la même famille de brevets		
IV. CERTIFICATION		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 28 MAI 1993	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 28 -06- 1993	
Administration chargée de la recherche internationale OFFICE EUROPEEN DES BREVETS	Signature du fonctionnaire autorisé GURDJIAN D.	

III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS ¹⁴		(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR LA DEUXIEME FEUILLE)
Catégorie °	Identification des documents cités, ¹⁶ avec indication, si nécessaire des passages pertinents ¹⁷	No. des revendications visées ¹⁸
Y	EP,A,0 243 856 (HOECHST A.G.) 4 Novembre 1987	1,19,20,22
A	voir le document en entier	2-7,15,16,21,23,24
A	EP,A,0 182 562 (SOLVAY & CIE.) 28 Mai 1986	1,19-24
A	JOURNAL OF BACTERIOLOGY vol. 172, no. 8, 1990, BALTIMORE US pages 4543 - 4548 SOZHAMANNAN S;DABERT P;MORETTO V;EHRlich S D;GRUSS A 'PLUS-ORIGIN MAPPING OF SINGLE-STRANDED DNA PLASMID P-E-194 AND NICK SITE HOMOLOGIES WITH OTHER PLASMIDS' cité dans la demande voir le document en entier	1,2,19-24
A	BIOLOGICAL ABSTRACTS vol. 87 Philadelphia, PA, US; abstract no. 047423, ALONSO J C;STIEGE C A;TAILOR R H;VIRET J-F 'FUNCTIONAL ANALYSIS OF THE DNA-TS MUTANTS OF BACILLUS-SUBTILIS PLASMID PUB110 REPLICATION AS A MODEL SYSTEM' voir abrégé & MOL GEN GENET 214 (3). 1988. 482-489.	1,9-11
A	BIOLOGICAL ABSTRACTS vol. 92 Philadelphia, PA, US; abstract no. 075453, LEENHOUTS K J;KOK J;VENEMA G 'REPLACEMENT RECOMBINATION IN LACTOCOCCUS-LACTIS' voir abrégé & J.BACTERIOL 173 (15). 1991. 4794-4798.	5,8
A	BIOLOGICAL ABSTRACTS vol. 88 Philadelphia, PA, US; abstract no. 107483, PRIEBE S D;LACKS S A 'REGION OF THE STREPTOCOCCAL PLASMID PMV158 REQUIRED FOR CONJUGATIVE MOBILIZATION' voir abrégé & J. BACTERIOL 171 (9). 1989. 4778-4784.	15

-/--

III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS ¹⁴		(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUEES SUR LA DEUXIEME FEUILLE)
Catégorie °	Identification des documents cités, ¹⁶ avec indication, si nécessaire des passages pertinents ¹⁷	No. des revendications visées ¹⁸
P,X	JOURNAL OF BACTERIOLOGY vol. 174, no. 17, 1992, BALTIMORE US pages 5633 - 5638 MAGUIN E;DUWAT P;HEGE T;EHRlich D;GRUSS A 'NEW THERMOSENSITIVE PLASMID FOR GRAM-POSITIVE BACTERIA' voir le document en entier -----	1-24

Formulaire PCT/ISA/210 (feuille supplémentaire) (Octobre 1981)

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.**

FR 9300248
SA 71737

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.

Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

28/05/93

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A-0445385	11-09-91	DE-A- 4006637	05-09-91
EP-A-0243856	04-11-87	DE-A- 3614310 JP-A- 62259592	29-10-87 11-11-87
EP-A-0182562	28-05-86	GB-A- 2166743 DE-A- 3584351 JP-A- 61173783	14-05-86 14-11-91 05-08-86

EPO FORM P072

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82